

Journées REPHY 2012

Nantes, 26 et 27 septembre 2012

Tome 2/2

Compilation des interventions pour la session
sanitaire, surveillance et recherche

Journées REPHY, 26 et 27 septembre 2012

Centre Ifremer de Nantes

Organisation des Journées :

Nadine Neaud-Masson

Catherine Belin

Session environnementale, surveillance et recherche

Animateurs durant la session :

Alain Lefebvre

Mireille Ryckaert

Raffaele Siano

La compilation des diaporamas présentés durant cette session sont disponibles dans le premier tome : Journées REPHY 2012. Tome 1. Compilation des interventions pour la session environnementale, surveillance et recherche

| | |
|--|--|
| DCE. Élément phytoplancton. Etat des lieux et dernières évaluations | Catherine Belin , Dominique Soudant & Alice Lamoureux Ifremer, Nantes |
| Indicateurs DCE physico-chimie en eaux côtières et de transition | Anne Daniel & Dominique Soudant Ifremer, Nantes et Brest |
| Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin (DCSMM). Première tentative de définition du Bon Etat Ecologique. Descripteur Eutrophisation | Alain Lefebvre Ifremer, Boulogne |
| DYMAPHY : développement d'un système d'observation dynamique pour la détermination de la qualité des eaux marines, basé sur l'analyse du phytoplancton | Luis Felipe Artigas et collaborateurs ULCO-CNRS-LOG, Wimereux |
| Analyse et modélisation des évolutions à long terme de la biodiversité phytoplanctonique dans les zones côtières sous l'effet des pressions environnementales et anthropiques. Avancement de la thèse. | Tania Hernández-Fariñas Ifremer, Nantes |
| Apports du réseau REPHY aux réseaux de l'Observatoire National de la Conchyliculture (RESCO et VELYGER) | Elodie Fleury , Eric Talarmain, Edouard Bédier & Stéphane Pouvreau Ifremer, La Trinité et Argenton |
| Variabilité interannuelle du phytoplancton et de la turbidité dans le Golfe de Gascogne observés de l'espace | Francis Gohin & P. Bryère Ifremer, Brest et ACRI-ST, Brest |
| Produits issus de l'Océanographie Côtière Opérationnelle pour la surveillance | Lucia Pineau-Guillou , Alain Ménesguen & Francis Gohin Ifremer, Brest |

| | |
|--|---|
| Démarche qualité pour la bancarisation des données REPHY | Mélanie Rapicault Ifremer, Nantes |
| Diffusion des données REPHY. Valorisations aux niveaux nationaux et internationaux | Antoine Huguet Ifremer, Nantes |
| Working Group on Phytoplankton and Microbial Ecology (WG-PME) | Dominique Soudant Ifremer, Nantes |
| Produits de données WEB | Alain Le Magueresse Ifremer, Nantes |
| Etude d'optimisation du REPHY. Perspectives à court et moyen terme | Catherine Belin Ifremer, Nantes |

Session sanitaire, surveillance et recherche

Animateurs durant la session :

Zouher Amzil

Catherine Belin

Nadine Neaud-Masson

| | |
|--|---|
| Perspectives d'évolution des dispositifs au regard des travaux relatifs à l'évaluation des risques au niveau Européen et de l'évolution des méthodes d'analyse | Virginie Hossen Anses, Maisons-Alfort |
| Point sur l'évolution du dispositif de surveillance des toxines lipophiles par analyse chimique | Sophie Trotereau Anses, Maisons-Alfort |
| Bilan national phytoplancton toxique et phycotoxines de 2009 à 2011 | Catherine Belin & Zouher Amzil Ifremer, Nantes |
| Dynamique spatio-temporelle des peuplements de <i>Pseudo-nitzschia</i> en Bretagne | Raffaele Siano et collaborateurs Ifremer, Brest et Concarneau |
| Variabilité de la diversité du phytoplancton en baie de Seine de 2002 à 2011. Efflorescences phytoplanctoniques toxiques en baie de Seine, projets TAPAS et FLAM | Mathilde Schapira et collaborateurs Ifremer, Port en Bessin et Université de Caen Basse Normandie |
| Influence de facteurs biotiques et abiotiques sur la physiologie et la production d'acide domoïque de <i>Pseudo-nitzschia</i> spp. | Aurélié Lelong, Hélène Hégaret & Philippe Soudant IUEM-LEMAR-UBO, Brest |
| Toxicité amnésiante dans les coquilles St Jacques des Pertuis charentais en 2010 - 2011 | Mireille Ryckaert Ifremer, La Rochelle |
| <i>Ostreopsis</i> en Méditerranée: enjeux, répartition géographique du stock macro-algal, vers une surveillance spécifique? | Hubert Grossel Ifremer, Toulon |
| Dispositif de vigilance phycotoxines. Bilan 2010-2011 | Nadine Neaud-Masson Ifremer, Nantes |
| Etude des Pinnatoxines en lien avec l'espèce <i>Vulcanodinium rugosum</i> | Philipp Hess Ifremer, Nantes |

Introduction à la session sanitaire

Jean François CADIOU

Directeur du Département Océanographie et Dynamique des Ecosystèmes (ODE)

Bonjour à tous, et bienvenue à ces Journées REPHY.

Comme cela a déjà été dit hier, le REPHY est un réseau à double finalité environnementale et sanitaire. La journée d'hier était centrée sur le volet environnemental. J'en ai retenu trois points :

- le phytoplancton apparaît dans 4 des 11 descripteurs du Bon Etat Ecologique de la DCSMM
- 2013 va être une année charnière avec la définition du programme de surveillance de cette directive qui devra être bien articulé avec la DCE
- cette surveillance pourra tirer parti de nouvelles méthodes et de technologies complémentaires à celles utilisées aujourd'hui (dont le satellite)

L'accent sera aujourd'hui mis sur le volet sanitaire. Nous aurons notamment des exposés de l'Anses sur les évolutions des dispositifs de surveillance des phycotoxines en Europe et en France.

Un bilan sera fait sur les occurrences des toxines ces dernières années. Et à la demande du Comité National des Pêches et Elevages Marins, qu'inquiète la fréquence des épisodes ASP, avec raison puisque ces épisodes touchent majoritairement les coquillages de pêche et en particulier les coquilles St Jacques, une session de quatre exposés sera consacrée à la problématique des toxines amnésiantes et de l'espèce *Pseudo-nitzschia* qui en est le principal producteur.

Pour prendre en compte les risques nouveaux, la surveillance des phycotoxines évolue d'année en année. Deux exemples relatifs à de nouvelles toxines seront détaillés, avec les palytoxines et les pinnatoxines en Méditerranée. Les études sur les palytoxines ont donné lieu à une surveillance particulière des oursins, désormais intégrée dans le REPHY, montrant que celui ci est capable de s'adapter rapidement, en termes de stratégies d'échantillonnage, mais aussi de méthodes. Ce sera sans nul doute le cas lorsque nous aurons analysé, ensemble avec l'ensemble des acteurs impliqués, l'épisode toxique PSP en rade de Brest cet été.

Cet épisode illustre bien la difficulté de comprendre et de prévoir les efflorescences algales toxiques. D'une grande virulence, un tel événement n'avait jamais été observé en rade. Il faudra peut-être attendre une ou plusieurs décennies pour un nouvel épisode similaire. D'où la nécessité d'acquérir des séries longues de données de qualité sur les communautés planctoniques mais aussi sur de nombreux paramètres environnementaux pour identifier les facteurs et comprendre les mécanismes déterminants dans leur apparition.

Perspectives d'évolution des dispositifs au regard des travaux relatifs à l'évaluation des risques au niveau Européen et de l'évolution des méthodes d'analyse

Virginie Hossen
Anses, Maisons-Alfort

**Perspectives d'évolution des dispositifs au regard
des travaux relatifs à l'évaluation des risques
au niveau Européen &
de l'évolution des méthodes d'analyse**

Virginie Hossen
Laboratoire National de Référence pour le contrôle des biotoxines marines
Anses - Laboratoire de sécurité des aliments de Maisons-Alfort

Journées REPHY - 26 & 27 septembre 2012 - Nantes

Présentation des travaux relatifs à l'évaluation des risques liés aux phycotoxines au niveau Européen

Evolutions réglementaires concernant les méthodes d'analyse



Quelques généralités pour commencer...

EVALUATION DES RISQUES

Objectifs :

- Fixation de **SEUILS SANITAIRES** (*limites de salubrité*)
- Proposition de **METHODES** d'analyse



EFSA



Anses

GESTION DES RISQUES

Objectif :

- Établissement de la **REGLEMENTATION**
(*arguments politiques, socio-économiques et sanitaires*)



DG SANCO



DGAI / DGS

SURVEILLANCE DE LA REGLEMENTATION



Réseau LR-UE/LNRs



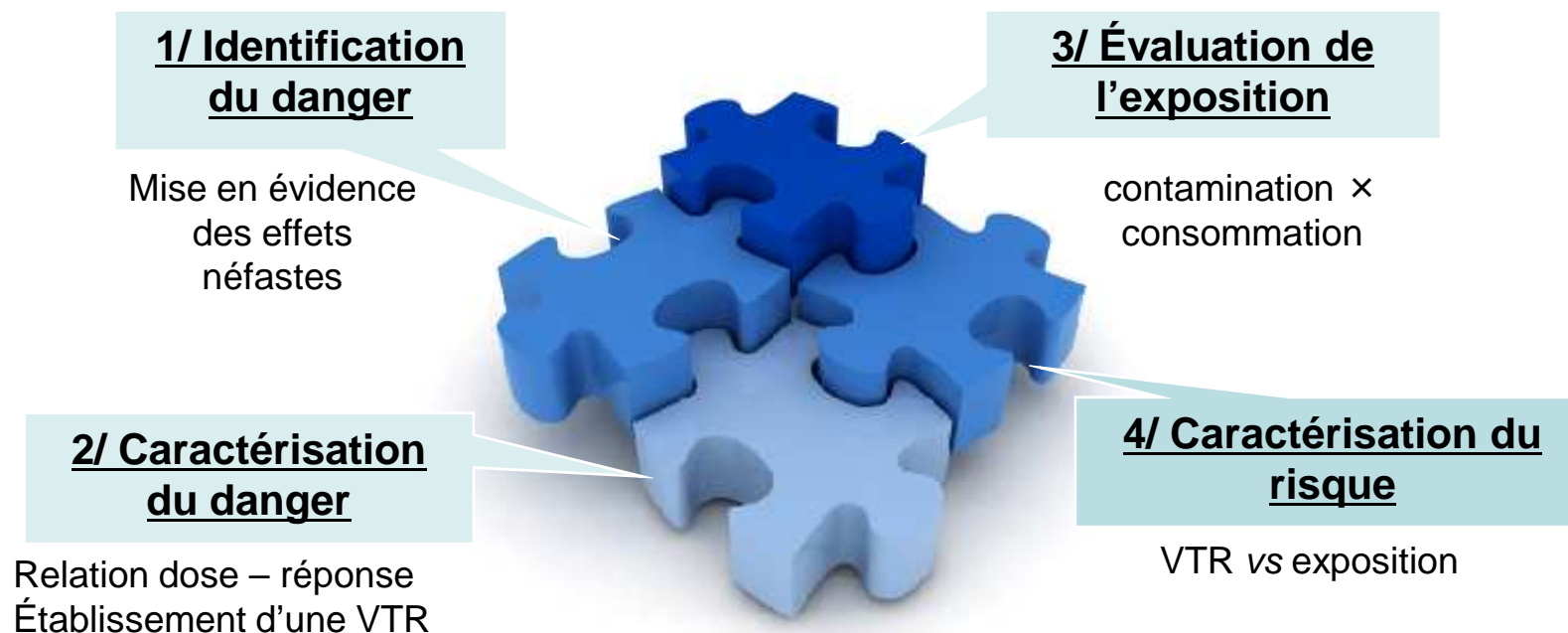
LNR et réseaux de labos REPHY et LDA

Rappel sur la méthodologie d'évaluation des risques :

DANGER : agent biologique, chimique ou physique pouvant avoir un effet adverse pour la santé.

≠

RISQUE : probabilité de survenue du danger - prise en compte de l'exposition au danger.



EQR = fondement de la décision réglementaire

Proposition de seuil sanitaire :

$VTR \times pc \text{ moyen} / \text{niveau de consommation}$

Rappel sur l'établissement de la Valeur Toxicologique de Référence - VTR :

✓ phycotoxines = toxicité aigüe

- **Nécessité d'établir une dose de référence aigüe (ARfD)**
- ARfD = quantité max. qui peut être ingérée par le consommateur pendant une courte période (au cours d'un repas ou d'un jour, dans la nourriture ou l'eau de boisson), sans effet dangereux pour sa santé.
en mg ou µg de substance par kilogramme de poids corporel.

✓ fixation de l'ARfD

$$\text{ARfD} = \frac{\text{NOAEL (ou LOAEL)}}{\text{FS}}$$

Identification de l'étude et de l'effet critique → NOAEL ou éventuellement LOAEL:

- Issues d'études toxicologiques chez l'animal
- Dans la pratique, pour les phycos, pête dose observée chez l'Ho (TIAC)

✓ choix du facteur de sécurité (FS)

Si la NOAEL est déduite d'une étude de toxicologie expérimentale chez l'animal : FS = 100
(x 10 : **variabilité interindividuelle**, x 10 : **diff. inter-espèces**)

Si la NOAEL est déduite de cas cliniques ou d'étude épidémiologique : FS = 3 à 10

éventuellement FS supplémentaire : **3, 10, 50** (avis d'experts)

ft (incertitudes sur le jeu de données, effets identifiés / CMR, passage LOAEL / NOAEL)

Travaux relatifs à l'évaluation des risques liés aux phycotoxines au niveau Européen...

DG SANCO a saisi l'Efsa (4 juillet 06) pour évaluer :

- les limites actuelles fixées par la réglementation UE au regard de la santé humaine

- les méthodes d'analyse des différentes toxines marines

- les risques liés aux toxines nouvelles / émergentes

→ *Prise en compte du seul risque lié à la consommation de coquillages (sauf CTX)*

SCIENTIFIC OPINION

Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Palytoxin group¹

Efsa Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM)^{2,3}

European Food Safety Authority (Efsa), Parma, Italy

ABSTRACT

The Efsa Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM Panel) assessed the risks to human health related to the presence of palytoxin (PITX)-group toxins in shellfish. PITX-group toxins have mainly been detected in soft corals of the genus *Palythoa* and in algae of the genus *Ostreopsis*. Blooms of *Ostreopsis* spp. have recently been reported in some European countries. Occurrence of *Ostreopsis* spp. may result in contamination of shellfish intended for human consumption. Currently there are no regulations on PITX-group toxins in shellfish, either in the European Union (EU), or in other regions of the world. The toxicological database of PITX-group toxins is limited, comprising only acute toxicity studies for PITX and ostreocin-D via several routes of administration in various animal species. The oral route was least sensitive. Acute toxicity and deaths have been reported from human outbreaks, but there are no reliable quantitative data on acute toxicity in humans. In view of the acute toxicity and the lack of chronic toxicity data for PITX-group toxins, the CONTAM Panel was only able to derive an oral acute reference dose (ARfD) of 0.2 µg/kg b.w. for the sum of PITX and its analogue ostreocin-D. In order for a 60 kg adult to avoid exceeding the ARfD a 400 g portion of shellfish meat should not contain more than 12 µg of the sum of PITX and ostreocin-D, corresponding to 30 µg/kg shellfish meat. The mouse bioassay (MBA) has been used to detect PITX-group toxins, but cell based assays have been developed as alternative. However, positive results require confirmation by chemical methods. High performance liquid chromatography-fluorescence detection (HPLC-FLD) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) methods can be valuable tools for the determination, but method optimisation and validation as well as the development of certified reference materials and standards are necessary.

KEY WORDS

Marine biotoxins, palytoxin (PITX)-toxin group toxins, shellfish, mussels, sea urchins, mouse bioassay (MBA), acute reference dose, portion size, methods of analysis, human health, risk assessment.

¹ On request from the European Commission, Question No Efsa-Q-2005-0650, adopted on 26 November 2005.

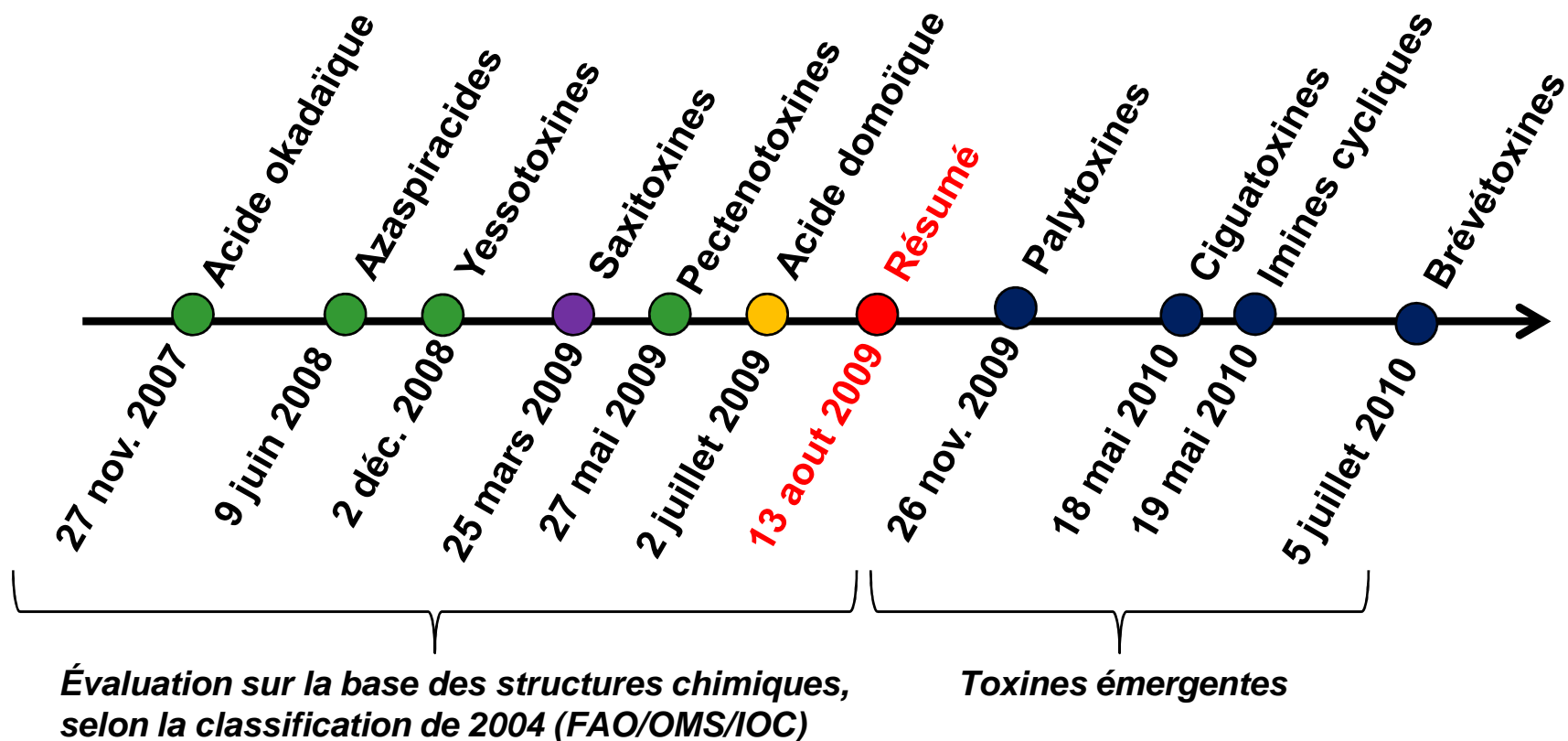
² Panel members: Jan Alexander, Diane Benford, Alan Boobis, Sandra Coccastelli, Jean-Pierre Cravedi, Alessandro Di Domenico, Daniel Dorigo, Eugenia Deglietti, Lutz Edler, Peter Farmer, Melika Filipič, Johanna Fink-Gremmler, Peter Flist, Thierry Guerin, Heide Katrine Knutsen, Miroslav Machala, Antonio Matti, Josef Schlatter, Rolf van Leeuwen and Philippe Vergès.

Correspondence: contam@efs.europa.eu

³ Acknowledgement: The Panel wishes to thank the members of the Working Group on marine biotoxins for the preparation of this opinion: Jan Alexander, Diane Benford, Luis Botana, Peter Flist, Gerhard Heinemeyer, Philipp Hess, Angelika Preuss-Weigert, Gian Paolo Rizzini, Hans van Egmond, Rolf van Leeuwen and Philippe Vergès, and Efsa's staff Mari Bakala and Francesco Viazani for the support provided to this Efsa scientific output.

Suggested citation: Efsa Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM); Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Palytoxin group. Efsa Journal 2009; 7(12):1393. [38 pp.]. doi:10.2903/efs.2009.1393. Available online: www.efs.europa.eu

Avis adoptés par l'Efsa depuis fin 2007 :

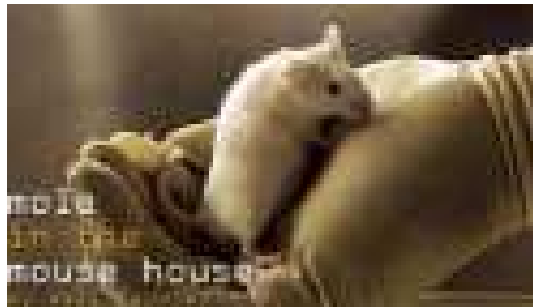


Avis sur l'influence des process / lipophiles : 25 mars 2009

Avis sur la consommation de 400g de chair de mollusques : 31 juillet 2010

Un problème global : des données toxicologiques limitées...

- Disponibilité des standards :
 - Faible quantité de toxines purifiées (quand disponible)
 - Certaines toxines d'intérêt non disponibles donc non testées
 - **Besoin de développement de standard et MRC**
- Quelques études de toxicité aigue chez l'animal
 - majorité des études = souris / IP
 - peu d'études par VO
 - toxicité chronique ?
- Peu/pas de données épidémiologiques humaines
 - **ARfD très dépendante du jeu de données toxicologiques**



Fixation de la dose de référence aiguë par famille :

| | Espèce | Effet | LOAEL ($\mu\text{g}/\text{kg pc}$) | FACTEUR DE SÉCURITÉ | ARfD ($\mu\text{g}/\text{kg pc}$) |
|-----------------------------|--|-------------------|---|------------------------|--|
| AO/DTX | Homme | Gastro-intestinal | 0,8 | 3 | 0,3 |
| AZA | Homme | Gastro-intestinal | 1,9 | (3*3) 9 | 0,2 |
| PTX | Souris | Gastro-intestinal | 250 | (100*3) 300 | 0,8 |
| YTX | Souris | Cardiotoxique | 5000 (NOAEL) | (100*2) 200 | 25 |
| STX | Homme | Neurotoxique | 1,5 | 3 | 0,5 |
| AD | Homme | Neurotoxique | 0,9 | (10*3) 30 | 30 |
| PITX | Souris | <i>Musculaire</i> | 200 | (100*10) 1000 | 0,2 |
| CTX | Données insuffisantes pour fixer ARfD Sur la base des cas humains (effets gastro-intestinaux, neurologiques, cardiovasculaires): « dose sans effet » chez l'Ho = 0,01 $\mu\text{g eq.P-CTX-1}/\text{kg poisson}$ | | | | |
| Imines cycliques | Données insuffisantes pour fixer ARfD | | | | |
| BTX | Données insuffisantes pour fixer ARfD | | | | |

Données de consommation :

- Choix : protection des forts consommateurs de mollusques bivalves
→ **consommation par repas de mollusques bivalves de 400g**



Photos source Efsa

Proposition de seuils sanitaires :

| | Rappel de l'ARfD (µg/kg pc) | Proposition de seuils sanitaires EFSA = ARfD × 60 / 0,4 | Limite réglementaire actuelle |
|---------------|--------------------------------|---|----------------------------------|
| AO/DTX | 0,3 | 45 µg eq.AO/kg | 160 µg eq.AO/kg |
| AZA | 0,2 | 30 µg eq.AZA1/kg | 160 µg eq.AZA1/kg |
| PTX | 0,8 | 120 µg eq.PTX2/kg | 160 µg eq.AO /kg |
| YTX | 25 | 3,75 mg eq.YTX/kg | 1 mg eq.YTX/kg |
| STX | 0,5 | 75 µg eq.STX/kg | 800 µg eq.STX/kg |
| AD | 30 | 4,5 mg AD+epiD/kg | 20 mg eq.AD/kg |
| | | | |
| PITX | 0,2 | 30 µg PITX + OSD/kg | — |
| CTX | Données insuffisantes | 0,01 µg eq.P-CTX-1/kg | — |
| IC | Données insuffisantes | — | — |
| BTX | Données insuffisantes | — | — |

- Sur la base des données disponibles, les limites réglementaires pour AO/DTX, AZA, STX et AD ne sont pas suffisamment protectrices pour le consommateur ≠ YTX et PTX
- Le BES-lipophiles (AO/DTX, AZA, PTX, YTX) n'est pas approprié à des fins de surveillance
La méthode LC-MS/MS multitoxines est spécifique et les LOD sont suffisamment basses pour atteindre les seuils proposés.
- Le BES-STX est capable de quantifier les toxines à la limite réglementaire mais pas à des quantités inférieures.
La méthode HPLC pour STX est capable de quantifier des niveaux de 10-80 µg eq.STX/kg.
- L'effet des process devrait être pris en compte dans la surveillance.

Au niveau international... norme *Codex Alimentarius* sur les MBV et crus....

CODEX STAN 292-2008

| Nom du groupe de biotoxines | Limite maximale/ kg de chair de mollusque |
|----------------------------------|---|
| Groupe des Saxitoxines (STX) | $\leq 0,8$ mg (2HCL) d'équivalent saxitoxines |
| Groupe de l'acide okadaïque (OA) | $\leq 0,16$ mg d'équivalent acide okadaïque |
| Groupe de l'acide domoïque (DA) | ≤ 20 mg d'acide domoïque |
| Groupe des Brévetoxines (BTX) | ≤ 200 unités souris ou équivalent |
| Groupe de l'Azaspiracide (AZP) | $\leq 0,16$ mg |

Pas de limites maximales pour YTX et PTX....

Au niveau méthodologique, projet de critères de performances pour les méthodes de référence/confirmation et les méthodes de dépistage (discussion au CCFFP32, oct.12)

Présentation des travaux relatifs à l'évaluation des risques liés aux phycotoxines au niveau Européen

Evolutions réglementaires concernant les méthodes d'analyse



Règlement 853/2004/CE du 30/04/04: définition des seuils réglementaires

La quantité totale de biotoxines marines (mesurées dans le corps entier ou dans toute partie comestible séparément) ne doit pas dépasser les limites suivantes:

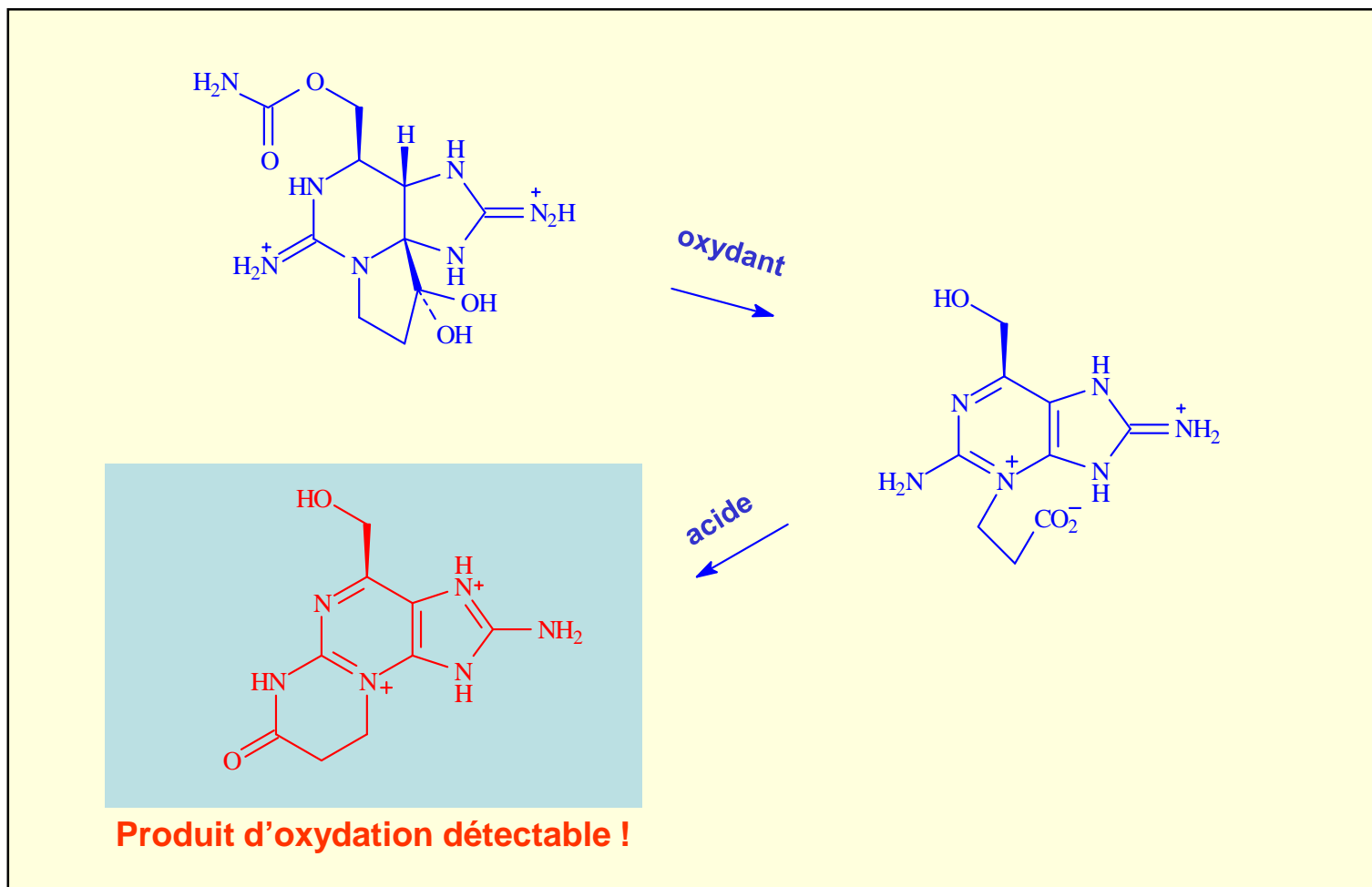
- a) pour le «Paralytic Shellfish Poison» (PSP), 800 microgrammes par kilogramme;
- b) pour le «Amnesic Shellfish Poison» (ASP), 20 milligrammes d'acide domoïque par kilogramme;
- c) pour l'acide okadaïque, les dinophysistoxines et les pectenotoxines pris ensemble, 160 microgrammes d'équivalent-acide okadaïque par kilogramme;
- d) pour les yessotoxines, 1 milligramme d'équivalent-yessotoxines par kilogramme,
et
- e) pour les azaspiracides, 160 microgrammes d'équivalent-azaspiracides par kilogramme.

Règlement 2074/2005/CE du 05/12/05 : définition des méthodes d'analyse (annexe III)

→ Modifié par le Règlement 1664/2006/CE du 06/11/06 pour le groupe de la STX (PSP)

1. La teneur en toxines paralysantes (*paralytic shellfish poison* — PSP) des parties comestibles des mollusques (corps entier ou toute partie consommable séparément) doit être déterminée conformément à la méthode d'analyse biologique ou à toute autre méthode reconnue au niveau international. La méthode dite de Lawrence, publiée en tant que méthode officielle 2005.06 de l'AOAC (*Paralytic Shellfish Poisoning Toxins in Shellfish*), peut également être utilisée pour la détection de ces toxines.
2. En cas de contestation des résultats, la méthode de référence est la méthode biologique.
3. Les points 1 et 2 seront revus lorsque le laboratoire communautaire de référence pour les biotoxines marines aura mené à bien l'harmonisation du protocole de la méthode de Lawrence.»

Quelle que soit la méthode chimique utilisée, étape de dérivation nécessaire:



Etat des lieux sur la méthode AOAC 2005.06 au niveau Européen :

Dérivation pré-colonne : formation des produits d'oxydation, séparation sur colonne mais comme certains produits d'oxydation sont communs à plusieurs toxines, séparation préalable sur cartouches SPE nécessaire

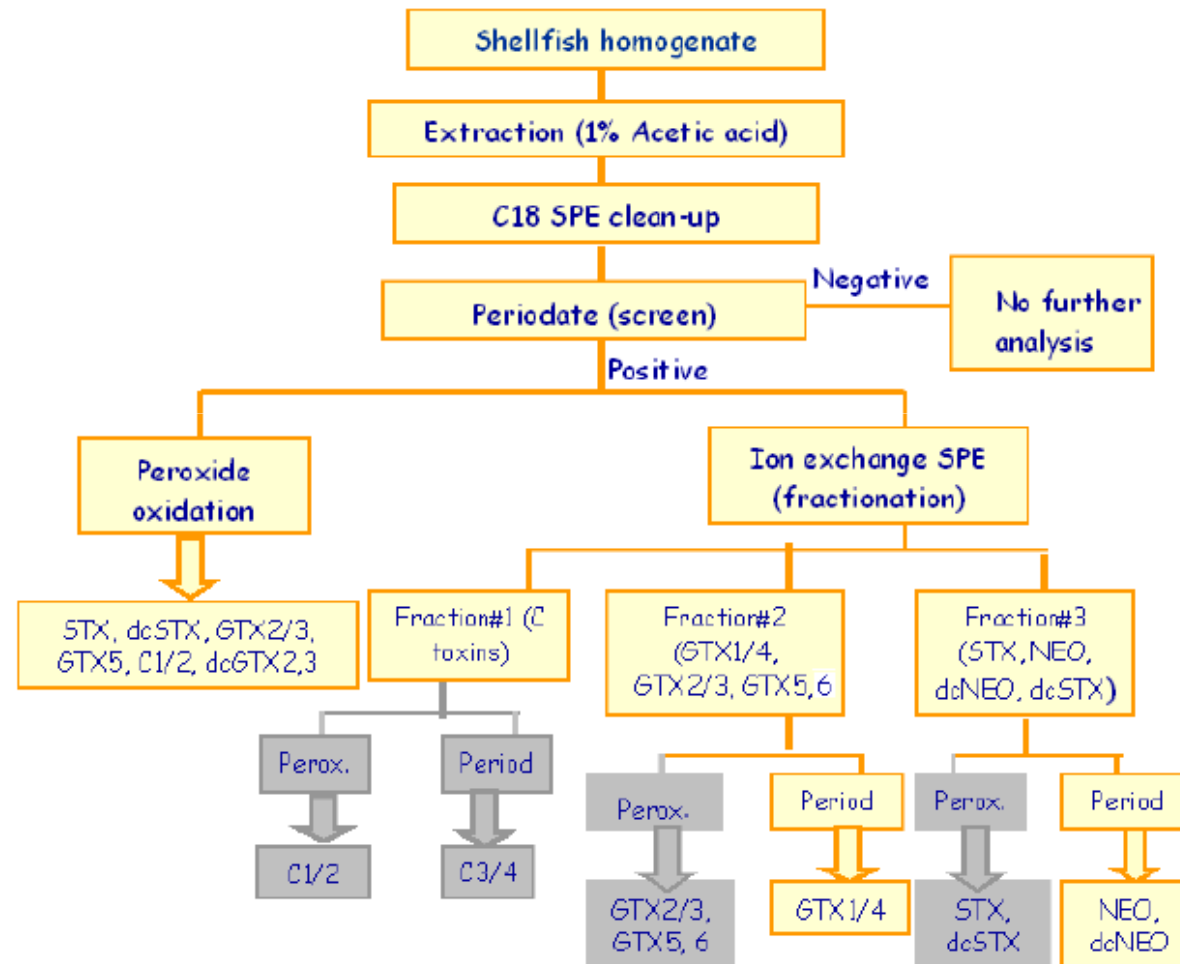


Figure 1. Scheme utilised for screening and quantitation of PSP toxins in mussel samples.

Etat des lieux sur la méthode AOAC 2005.06 au niveau Européen :

-1^{er} EILA organisé par le Laboratoire Communautaire de Référence fin 2005 → estimation de la toxicité parfois sous-estimée (GTX6, C1/2, C2/3, GTX5 et dc-STX)

-difficultés d'interprétation des chromatogrammes obtenus, absence de disponibilité des étalons pour tous les analogues (C3/4, GTX6, dcGTX1/4)

décembre 2009 : document pratique indiquant les problèmes techniques rencontrés lors de la mise en œuvre de la méthode

http://www.aesan.msc.es/CRLMB/docs/docs/ayuda_cientifica/CRLMB-WG_PSP-HPLC_Working_Document_Technical_issues_and_pitfalls_AOAC_2005_06.pdf

→ En décembre 2009, validation inter-laboratoire de la méthode PCOX
Rourke, W.A. et al. (2008) Rapid Postcolumn Methodology for Determination of Paralytic Shellfish Toxins in Shellfish Tissue. J.AOAC Int 91(3), 589-597.

= **OMA AOAC 2011.02**

Dérivation post-colonne :

Avantages par rapport à la méthode AOAC 2005.06 :

- *Méthode d'extraction simple (pas de purification sur cartouches)*
- *Séparation des isomères → estimation de la toxicité plus précise*
- *Chaque toxine correspond à un produit d'oxydation → identification des toxines plus facile*

Quelques inconvénients de la méthode AOAC 2011.02 :

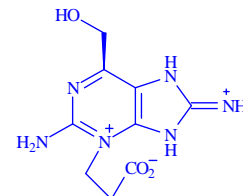
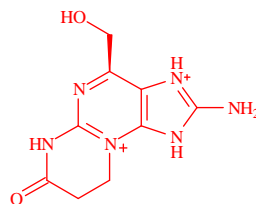
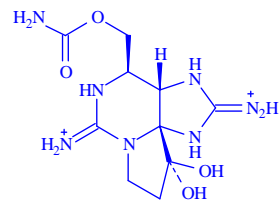
- Non validée pour dc-NEO et GTX6
- utilisation de **2 colonnes chromatographiques** (pour toxines C et pour GTXs/STXs)

→ Quelle méthode mettre en place si le bioessai doit être remplacé en surveillance ?

- Méthodes complexes et lourdes (méthode PCOX nécessite 2 pompes supplémentaires + 1 réacteur (tube Teflon))
- Plusieurs analyses par échantillon : **2-3 jours pour une analyse complète**
- Méthode AOAC 2005.06 longue et fastidieuse mais toutes les analyses peuvent être effectuées dans la foulée
- Méthode PCOX un peu plus longue mais plus simple

Plutôt qu'une méthode HPLC....

- Méthode RBA (OMA AOAC 2011.27) ? utilise des standards Ra*
- Méthode de dépistage type ELISA ?



Règlement 2074/2005/CE du 05/12/05 : définition des méthodes d'analyse (annexe III)

→ Modifié par le Règlement 1244/2007/CE du 24/10/07 pour le groupe de l'AD (ASP)

La teneur totale en toxines amnésiantes (*amnesic shellfish poison* — ASP) des parties comestibles des mollusques (corps entier ou toute partie consommable séparément) doit être déterminée par chromatographie liquide haute performance (CLHP) ou par toute autre méthode reconnue au niveau international.

Toutefois, à des fins de dépistage, la méthode 2006.02 ASP ELISA, telle que publiée dans le *Journal of AOAC International* en juin 2006, peut également être utilisée pour déterminer la teneur totale en ASP des parties comestibles de mollusques.

En cas de contestation des résultats, la méthode de référence est la méthode de CLHP.

| | HPLC-UV sans étape de purification | ELISA |
|---|------------------------------------|-------------|
| Estimation du temps d'analyse pour une série de 6 échantillons (sans l'étape de préparation des échantillons, équivalente quelle que soit la méthode) | 17h (9,5h d'injection) | 2,5h |
| LOD | 1,0 mg/kg | 0,003 mg/kg |
| LOQ | 3,0 mg/kg | 0,01 mg/kg |
| CV répétabilité | 1,2 à 8% | 15±4% |
| CV reproductibilité | 8 à 23% | 23±6% |
| Rendement | 81 à 118 % | 104±10% |

Règlement 2074/2005/CE du 05/12/05 : définition des méthodes d'analyse (annexe III)

→ Modifié par le Règlement (UE) n° 15/2011 du 10/01/2011 pour le groupe des toxines lipophiles (AO/DTX, PTX, AZA, YTX) :

Une méthode de chromatographie liquide – spectrométrie de masse (LC-MS/MS) a été validée dans le cadre d'une étude de validation interlaboratoires menée par les États membres et coordonnée par le laboratoire de référence de l'Union européenne pour les biotoxines marines (EU-R.L.M.B.). Cette méthode peut être librement consultée sur la page web d'EU-R.L.M.B. (<http://www.aesan.msps.es/fr/CRLMB/web/home.shtml>).

Cette technique validée de chromatographie liquide (LC) – spectrométrie de masse (MS) doit être la méthode de référence pour la détection de toxines lipophiles et être systématiquement utilisée tant pour les contrôles officiels à tous les stades de la chaîne alimentaire que pour les autocontrôles des exploitants du secteur alimentaire.

Après la période fixée au point B 1. du présent chapitre, le dosage biologique sur souris est utilisé uniquement pour le contrôle périodique des zones de production et de reparcage destiné à la détection de toxines marines nouvelles ou inconnues sur la base des programmes de contrôle nationaux élaborés par les États membres

- En France, BES maintenu dans le cadre d'un dispositif de vigilance
- (période de transition) utilisation BES autorisée jusqu'au 31/12/2014

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

- ✓ **Depuis 01/2011 : Évolution de la méthode de référence pour les toxines lipophiles & évolution du dispositif français en lien avec ce changement**
 - Réseau de laboratoires nouvellement constitué
 - Dispositif de vigilance en complément de la surveillance
- ✓ **Quid des toxines non réglementées présentes en France ?**
- ✓ **Vers un remplacement du bioessai sur souris pour l'analyse des STX ?**
- ✓ **Vers une surveillance étendue aux espèces autres que bivalves ?**

MERCI DE VOTRE ATTENTION !

Point sur l'évolution du dispositif de surveillance des toxines lipophiles par analyse chimique

Sophie Trotereau
Anses, Maisons-Alfort



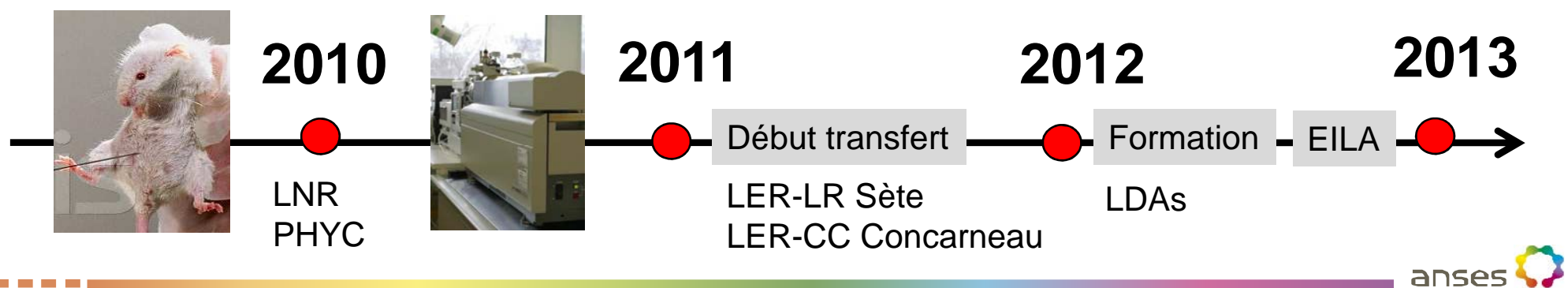
Point sur l'évolution du dispositif de surveillance des toxines lipophiles par analyse chimique

Sophie TROTÉREAU
LNR Biotoxines marines

ANSES - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
Laboratoire de sécurité des aliments de Maisons-Alfort

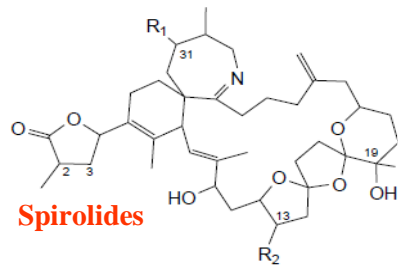
Eléments abordés

- Contexte passage Bio essai → LC-MS/MS
- Dispositifs de surveillance et de vigilance depuis janvier 2010
- Présentation de la méthode CAT-NAT 07
- Transfert de la méthode au réseau de laboratoires
- Résultats de EILA_Anses LSAI_CAT-NAT_2012_01
- Conclusion et perspectives

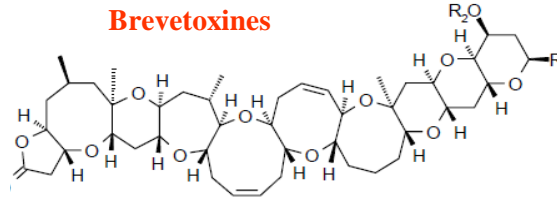




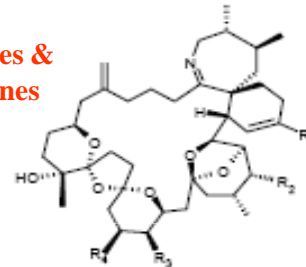
Passage du bio essai sur souris
(toxicité globale)
→ surveillance ciblée des toxines
réglementées (profil toxinique)



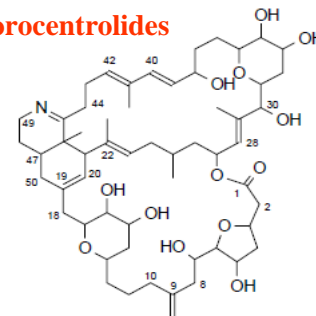
Toxines lipophiles (DSP)



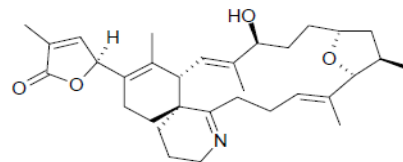
Pinnatoxines & pteriatoxines



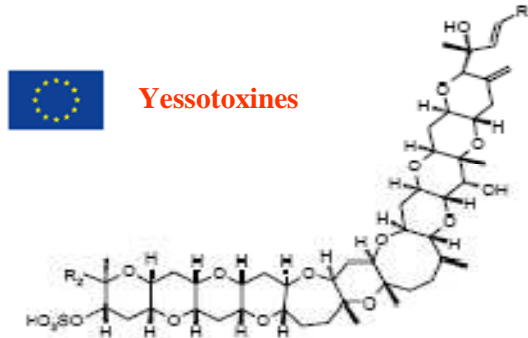
Prorocentrolides



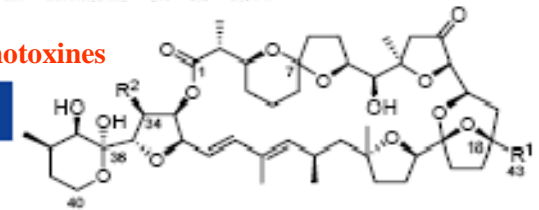
Gymnodimine



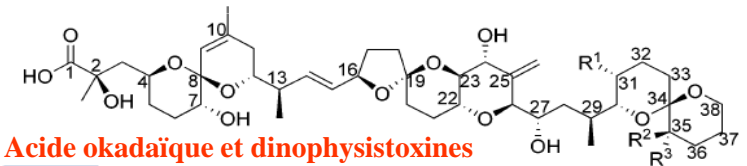
Yessotoxines



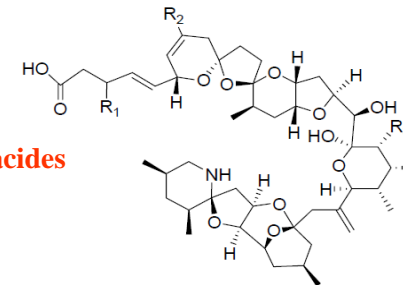
Pectenotoxines



Acide okadaïque et dinophysistoxines



Azaspiracides

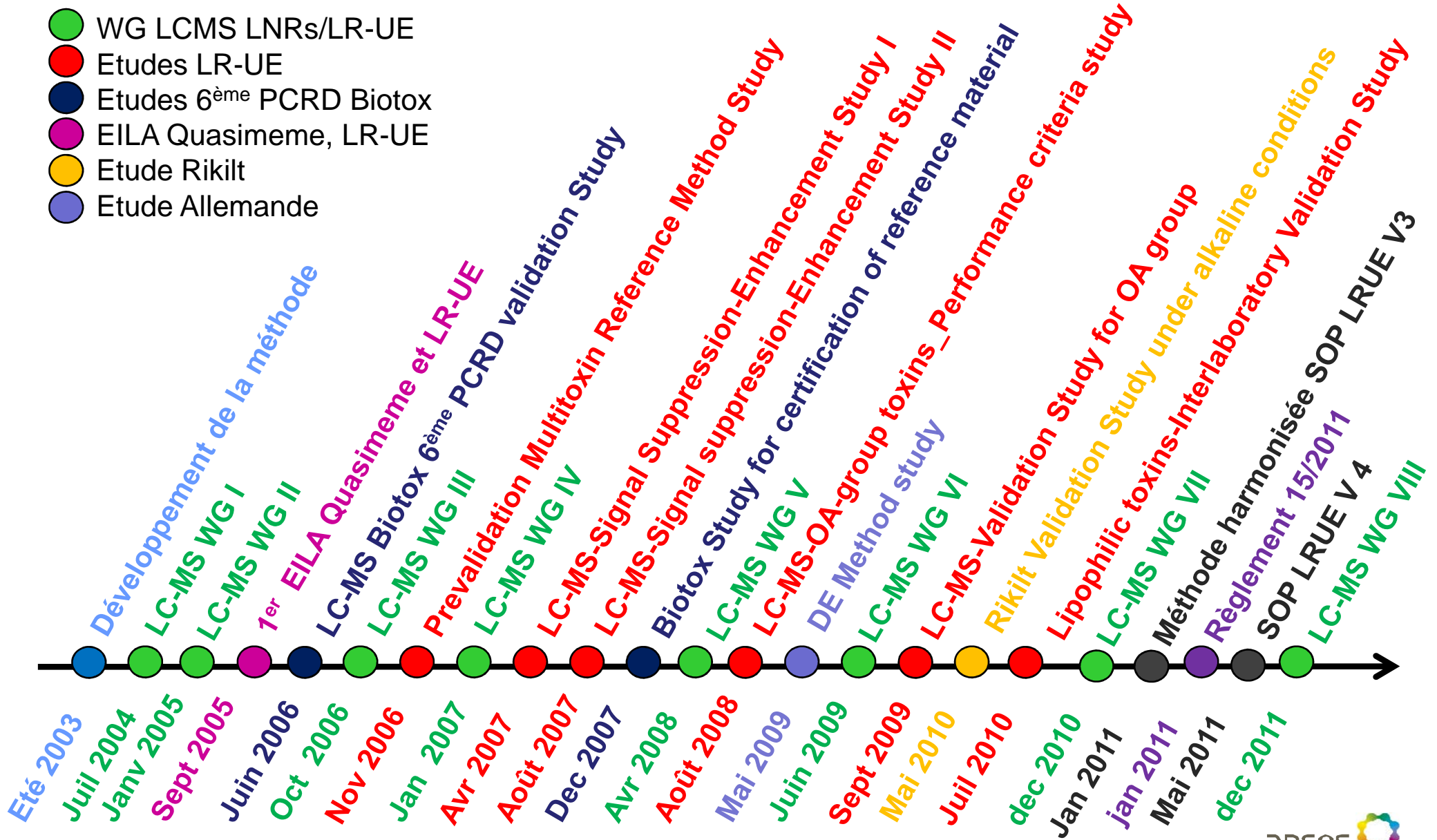


Règlement (EC) 853 / 2004 du 29/04/04
Règlement (EC) 15/2011 du 10/01/11 qui
amende le 2074 / 2005 du 05/12/2005

Consolidation de la méthode LC-MS/MS au fil des ans

Journées REPHY 26 et 27 sept 2012

- WG LCMS LNRs/LR-UE
- Etudes LR-UE
- Etudes 6^{ème} PCRD Biotox
- EILA Quasimeme, LR-UE
- Etude Rikilt
- Etude Allemande



Application de la méthode LC-MS/MS en France à partir de 2010 (demande MAAP B. Le Maire)

Surveillance effectuée par 2 laboratoires (période transitoire de 2 ans 2010-2011)

Méthode introduite dans la réglementation communautaire depuis le 10 jan 2011 (arrêt bioessai → 31 dec 2014)

Ifremer

Laboratoire PHYC, Nantes

Zones de production



≈1200 analyses / an

Délai de réponse ≈ 4 jours

→ 3 jours en 2011

**(transfert LR-CC et LR-LER
mi2011)**



API4000



LNR Biotoxines marines

Coquillages (produits finis)



607 analyses en 2010

447 PSPC DGAL

145 auto-contrôles + 15 TIAC

643 analyses en 2011

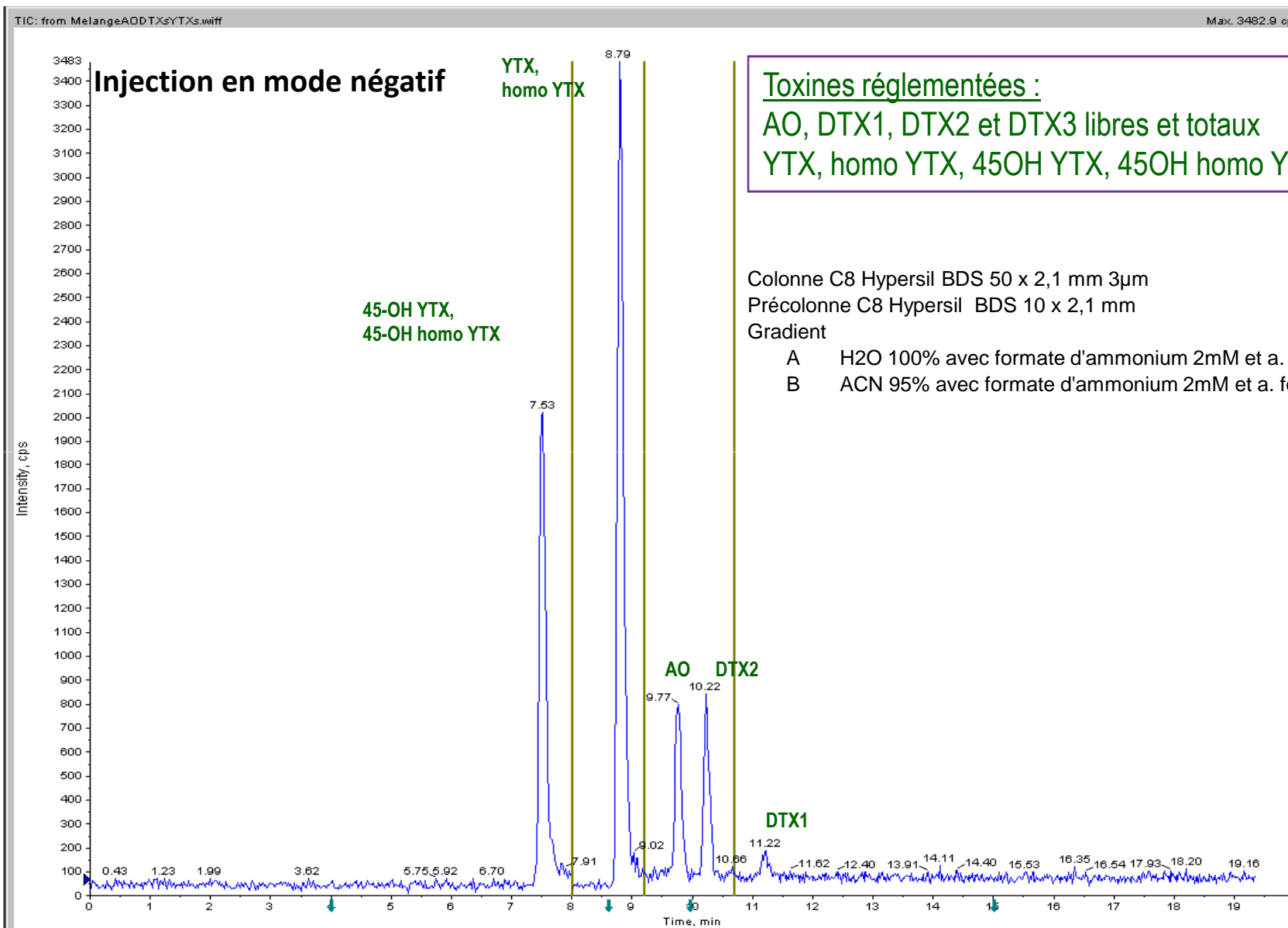
440 PSPC DGAL

189 auto-contrôles + 14 TIAC

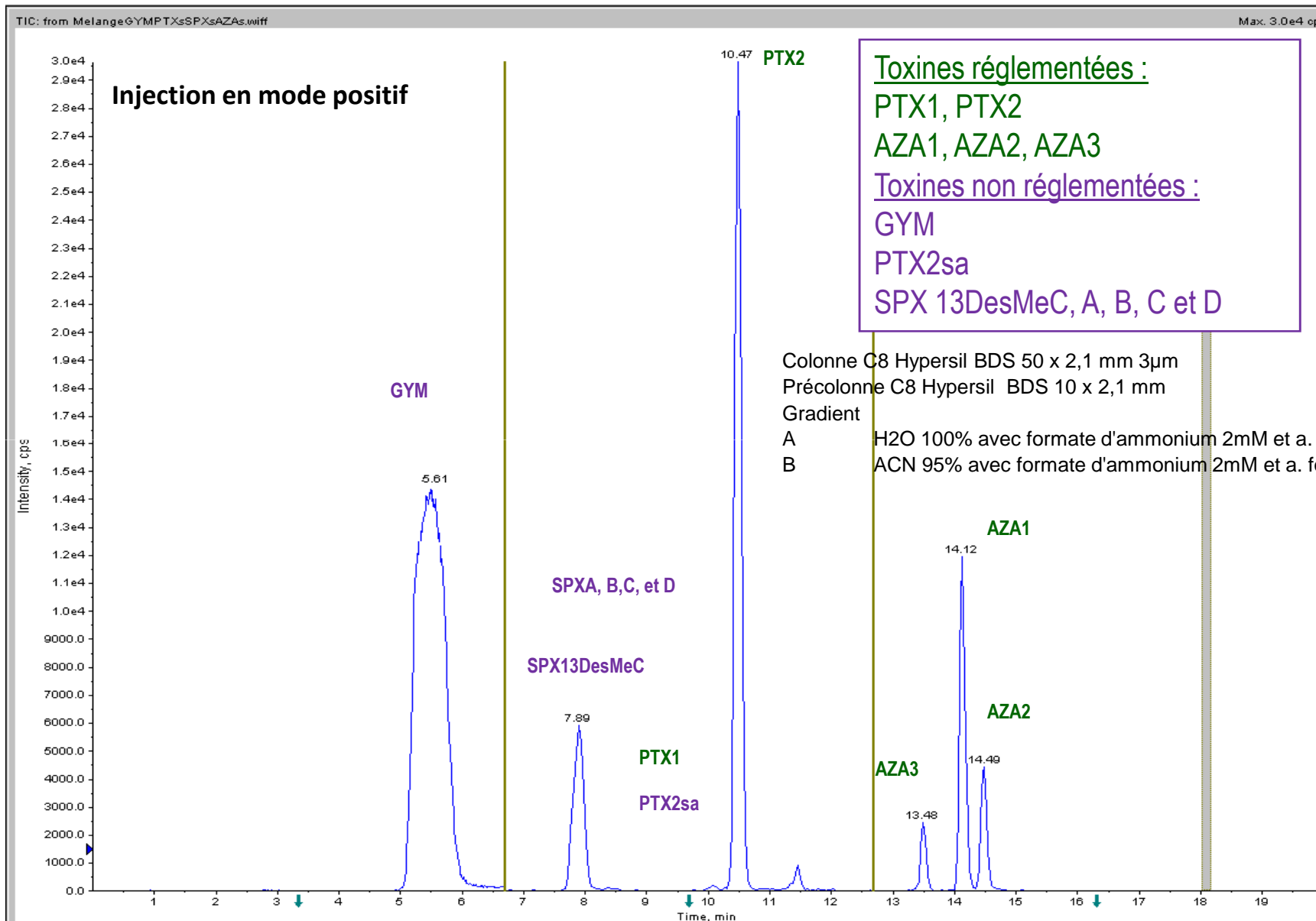
Délai de réponse 5 à 10 jours

Chromatogramme en mode négatif

LNR



LNR

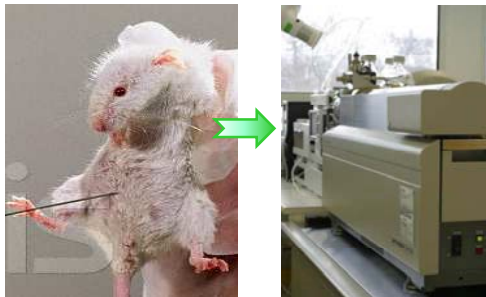


Règlement (UE)
N° 15/2011
de la commission
du 10 janvier 2011
qui amende
le 2074 / 2005
du 05/12/2005 :

La méthode LC-MS/MS est la méthode de référence pour la détection des toxines marines visées à l'annexe III du règlement (CE) N° 853/2004.

Cette méthode détermine au moins les substances suivantes:

- groupe acide okadaïque: OA, DTX1, DTX2, DTX3, y compris leurs esters;
- groupe des pecténotoxines: PTX1 et PTX2;
- groupe des yessotoxines: YTX, 45OH YTX, homo YTX et 45OH homo YTX,
- groupe des azaspiracides: AZA1, AZA2 et AZA3.



Toxicité
globale

Profil
toxinique

Conformément à l'avis de EFSA de 2009 (1306, 1-23), les facteurs d'équivalence toxique (TEF) sont appliqués pour les toxines réglementées suivantes

AO=1, DTX1=1, DTX2=0.6, DTX3=cf toxine libre,
PTX1=1, PTX2=1,
AZA1=1, AZA2=1.8, AZA3=1.4,
YTX=1, homo YTX=1, 45-OH YTX=1, 45-OH homo YTX=0.5

Règlement (CE)
N° 853/2004
du parlement européen
du 29 avril 2004 :

AO+DTXs+PTXs -> seuil 160µg eq AO /Kg

AZAs -> seuil 160µg eq AZA/Kg

YTXs -> seuil 1mg eq YTX/Kg

Application de la méthode validée en interlaboratoire du LR-UE

Méthode Anses Maisons-Alfort CAT-NAT 07 rev02 du 04 oct 2011 selon la méthode officielle harmonisée LRUE Vigo version 4 de mai 2011 sur le site

http://www.aesan.msps.es/en/CRLMB/web/procedimientos_crlmb/crlmb_standard_operating_procedures.shtml

Transfert de la méthode à un réseau de laboratoires (2 Labo côtiers puis 11 LDAs)

Appel à candidature + Formation du réseau + Participation à un EILA

Assurance Qualité

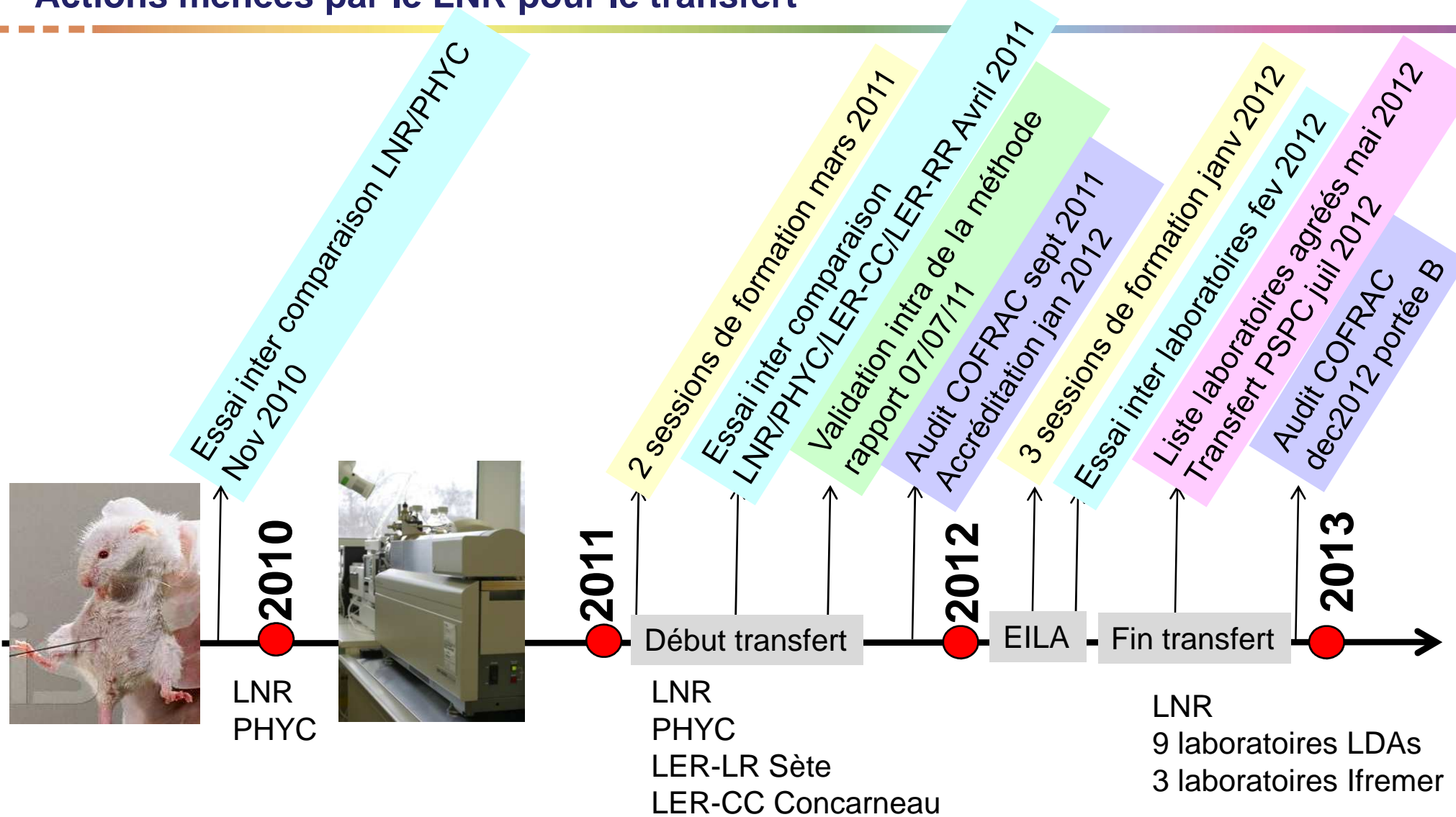
Méthode accréditée COFRAC selon LAB_GTA_21 (Annexe technique ANSES jan2012)

Transfert des contrôles en 2011-2012



Actions menées par le LNR pour le transfert

Journées REPHY 26 et 27 sept 2012



Liste des 12 laboratoires agréés : note de service DGAL/SDPRAT/N2012-8096 du 03/05/2012

<http://agriculture.gouv.fr/laboratoires-agrees-methodes-officielles-alimentation-568>



Echantillon N° Lipo1

≈ 100 g de broyat de moules naturellement contaminées origine Irlande et
≈ 100 g de broyat de moules non contaminées origine Chili.



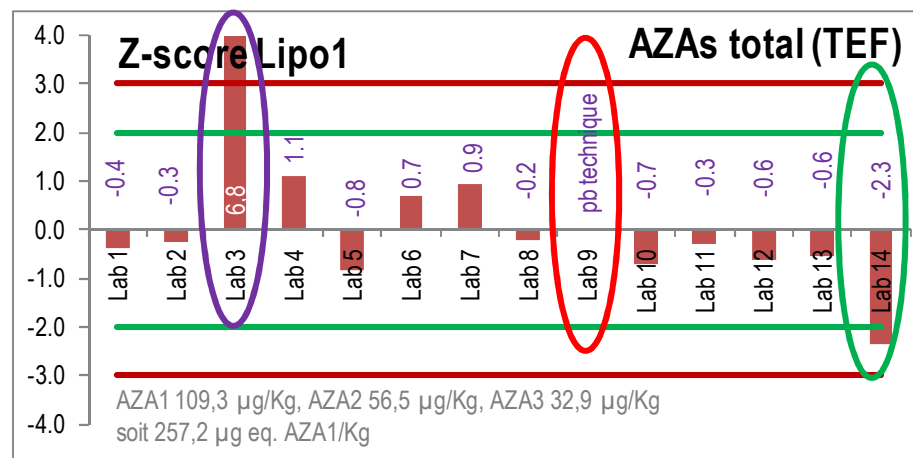
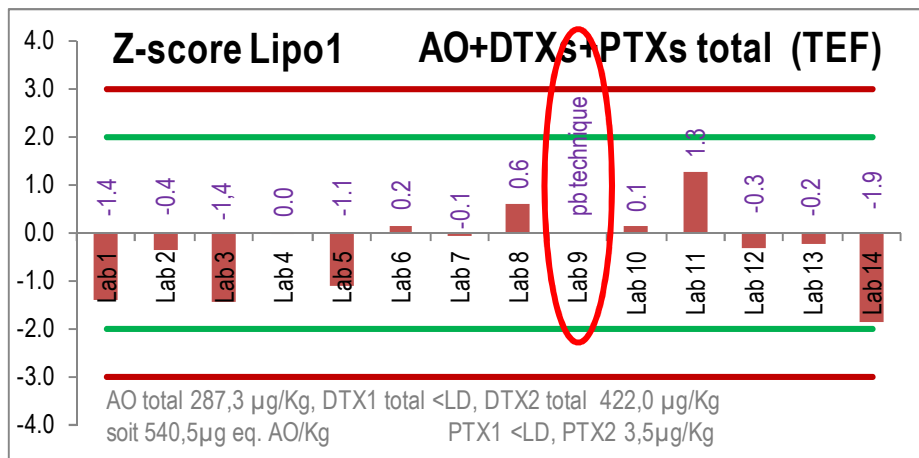
| | |
|--|---------------------------------|
| AO+DTXs+PTXs (TEF) = 540,5 µg eq.AO/kg | > seuil de 160 µg eq.AO/kg |
| AZAs (TEF) = 257,2 µg eq.AZA/kg | > seuil de 160 µg eq.AZA/kg |
| YTXs (TEF) = 5,3 µg eq.YTX/kg | <<< seuil de 1 m eq.YTX/kg (LQ) |

Echantillon N° Lipo2

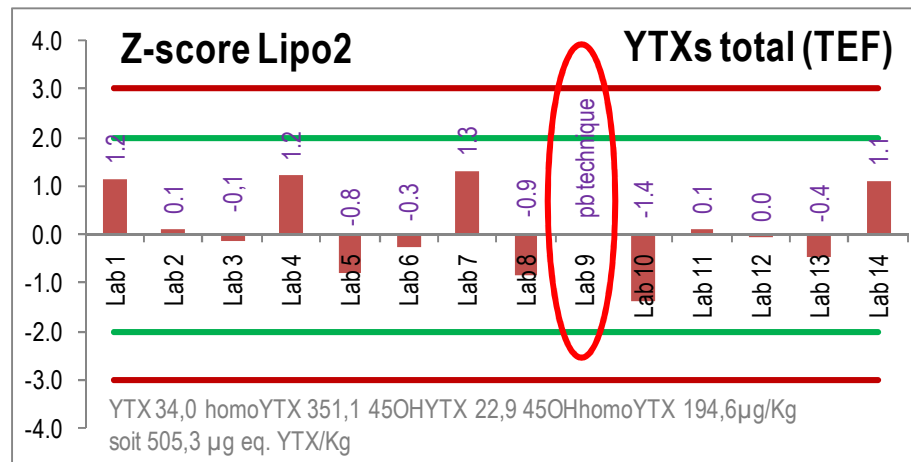
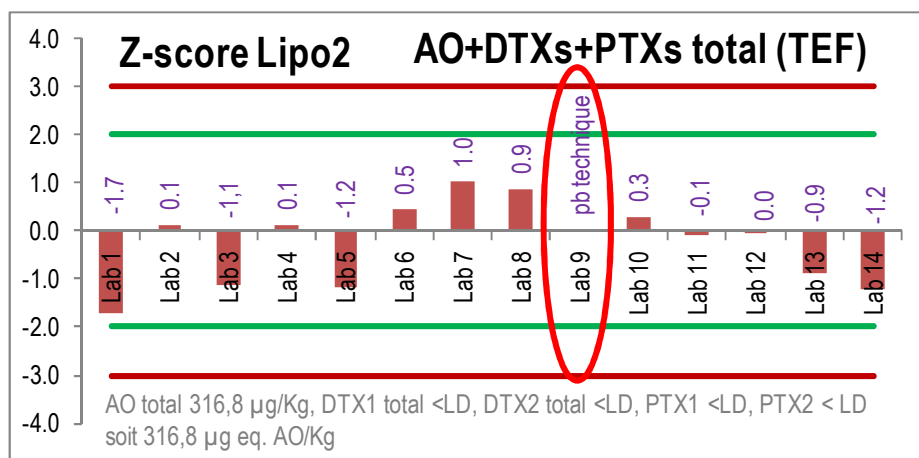
≈ 50 g de broyat de moules naturellement contaminées origine Italie,
≈ 50 g de broyat de moules naturellement contaminées origine France et
≈ 100 g de broyat de moules non contaminées origine France Coutainville.

| | |
|--|---------------------------------|
| AO+DTXs+PTXs (TEF) = 316,8 µg eq.AO/kg | > seuil de 160 µg eq.AO/kg |
| AZAs (TEF) < LD | <<< seuil de 160 µg eq.AZA/kg |
| YTXs (TEF) = 506,3 µg eq.YTX/kg | 1/2 seuil de 1 m eq.YTX/kg (LQ) |

Résultats de l'échantillon Lipo1 (Acide okadique et dinophysistoxines et azaspiracides > seuil)



Résultats de l'échantillon Lipo2 (Acide okadique et dinophysistoxines > seuil et yessotoxines 1/2 seuil)



Sur les 14 laboratoires participants 12 ont rendu des résultats satisfaisants.

<http://www.nrc-cnrc.gc.ca/eng/programs/imb/crmp.html>



[Français](#) |
 [Home](#) |
 [Contact Us](#) |
 [Help](#) |
 [Search](#) |
 [canada.gc.ca](#)

NRC Home > Institutes and Programs > NRC Institute for Marine Biosciences > Research > NRC-IMB Programs > Certified Reference Materials Program

- About NRC
- Business Opportunities and Services
- Our Research
- Institutes and Programs
 - NRC Institute for Marine Biosciences
- Research
 - Certified Reference Materials Program
 - Functional Genomics
 - Marine Bioactives
 - Biofuels from algae
 - Biomarkers
 - Algal Biotoxins
- Facilities
- Industry Partnership Facility
- NRC-IMB News
- Events and Conferences



Certified Reference Materials Program

The Certified Reference Materials Program of the National Research Council Canada Marine Biosciences Measurement Standards Division provides certified reference materials for marine and freshwater biotoxins.

Established in 1998, the program is the primary producer of biotoxin reference materials for analysts worldwide.

About CRMP

- Notices and Archived Notices
- History

Marine and Fresh Water Toxins

Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP) and other Lipophilic Toxins

- CRM-AZA1
- CRM-AZA2
- CRM-AZA3
- CRM-AZA-Mus - NEW RELEASE
- CRM-DSP-Mus-b
- CRM-DTX1 - NEW RELEASE
- CRM-DTX2 - NEW RELEASE
- CRM-GYM
- CRM-hYTX - NEW RELEASE
- CRM-OA-C
- CRM-PTX2 ✘
- CRM-SPX1
- CRM-YTX ✘

Search

NRC Section

Information

Research & Programs

- Technology Research
- Canada Institute for Space and Technical Research
- Canadian Hydraulic Centre
- Canadian Neutron Beam Centre
- Canadian Photonics Centre
- Centre for Surface Transportation Technology
- NRC Genomics and Health Initiative
- NRC Herzberg Institute of Astrophysics

Echantillons analysés par le LNR (jan 2010 à juin 2012)

| jan 2010 à juin 2012 | Moules | Huîtres | Pectinides | Autres mollusques bivalves | Total |
|-------------------------|------------|------------|------------|-------------------------------|-------------|
| TIAC | 19 (3+) | 8 | 3 | 1 | 31 |
| AC | 207 | 18 | 139 | 34 | 398 |
| PSPC | 363 (1+) | 329 | 345 | 32 | 1069 |
| Total | 589 | 355 | 487 | 67 | 1498 |

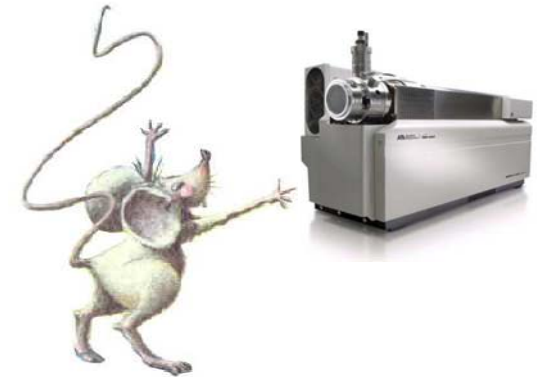
Echantillons non conformes

| Nature | Demandeur | Réception | Origine | Résultats |
|--------|-----------------|------------|---------|--|
| Moules | DDPP 44 PSPC | 29 juin 10 | France | 531,4 µg AO/ kg chair 26,6 µg SPX13desMe C/ kg chair Autres toxines ≤ LD |
| Moules | DDPP 34 TIAC | 20 sept 10 | Espagne | 533,6 µg AO/kg chair 1,1 µg SPX13desMeC/kg chair PTX2sa = 5,7 µg PTX2/kg chair Autres toxines ≤ LD |
| Moules | DDPP 34 TIAC | 24 sept 10 | Espagne | 505,6 µg AO/kg chair 1,2 µg SPX13desMeC/kg chair Autres toxines ≤ LD |
| Moules | DDPP 34 TIAC | 24 sept 10 | Espagne | 463,6 µg AO/kg chair 1,4 µg SPX13desMeC/kg chair Autres toxines ≤ LD |

- 31 investigations de TIAC
- 1069 ech plan de surveillance DGAL
- 398 ech d'auto-contrôle privés

- 4 non conformes (AO > seuil)
- 1 non conforme (AO > seuil)
- 0 non conforme

- ❖ Depuis janv 2010 ce dispositif de surveillance semble garantir la sécurité du consommateur
- ❖ Réseau de laboratoires constitué
Liste des laboratoires agréés : note de service DGAL/SDPRAT/N2012-8096 du 03 mai 2012 suite à l'EILA de fev 2012.
- ❖ Transfert complet du PSPC DGAL et des auto-contrôles privés aux laboratoires agréés depuis le 1er juil 2012
- ❖ Paramétrage de la méthode pour transmission dans SIGAL (outil DGAL)
- ❖ Etude en cours des nouveaux étalons certifiés NRCC
- ❖ Prochain EILA programmé fin 2012 (envoi des demandes de participation début octobre).
- ❖ Réunion du réseau du LNR biotoxines à Maisons-Alfort le 13 nov 2012



Merci de votre attention

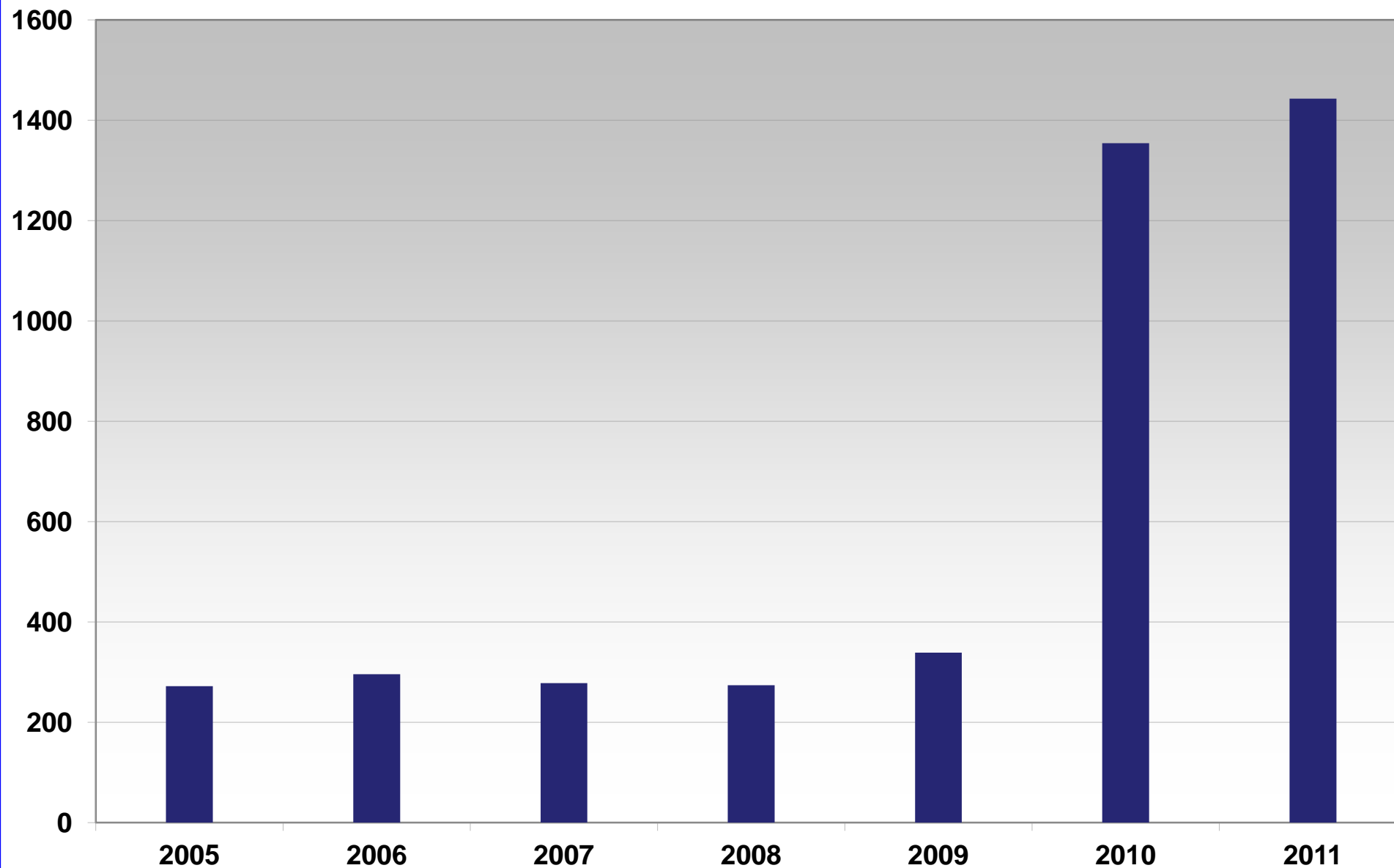
Bilan national phytoplancton toxique et phycotoxines de 2009 à 2011

Catherine Belin & Zouher Amzil
Ifremer, Nantes

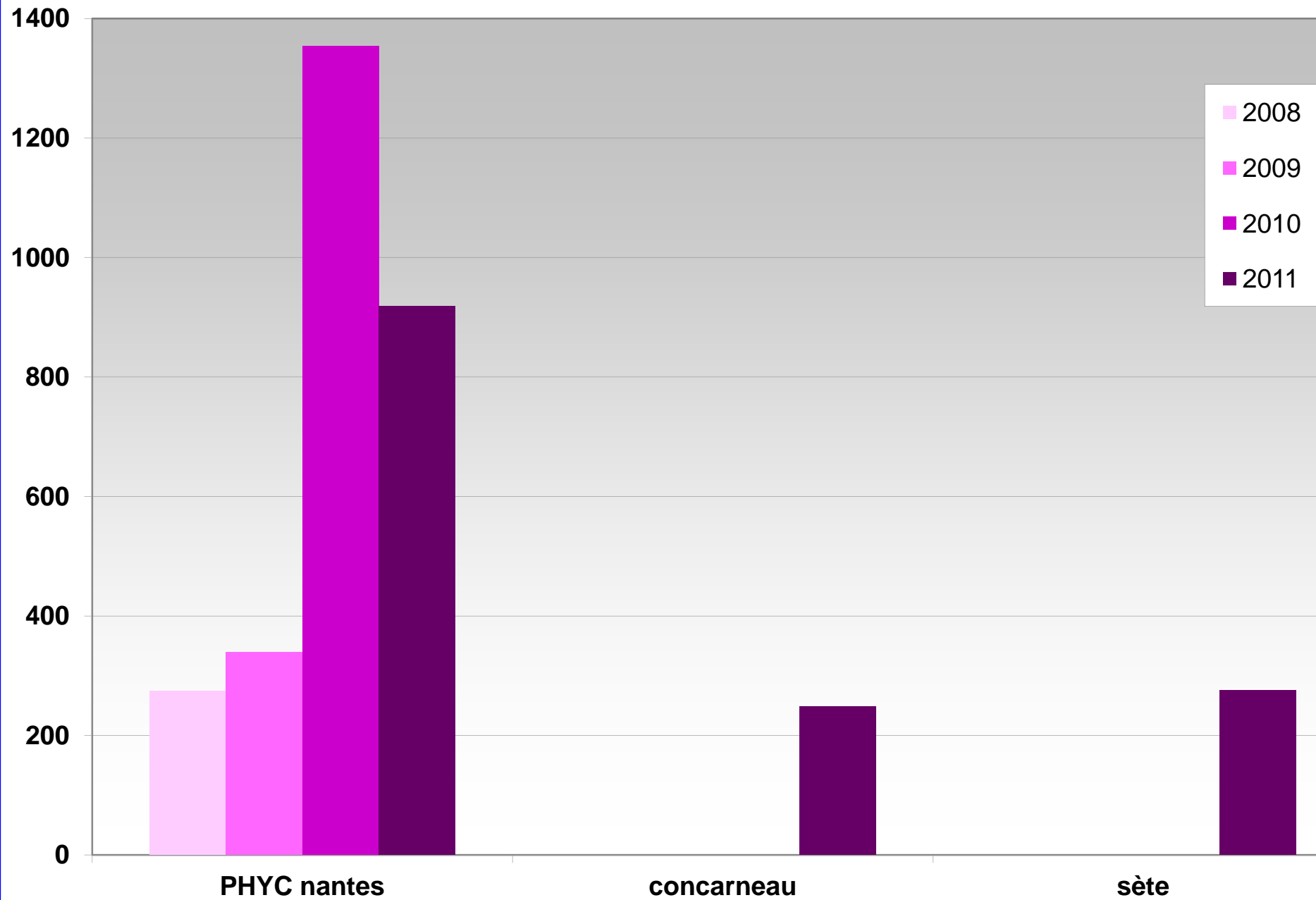
Bilan national
phytoplancton toxique et phycotoxines
2009 - 2011

Catherine Belin & Zouher Amzil
Ifremer, Nantes

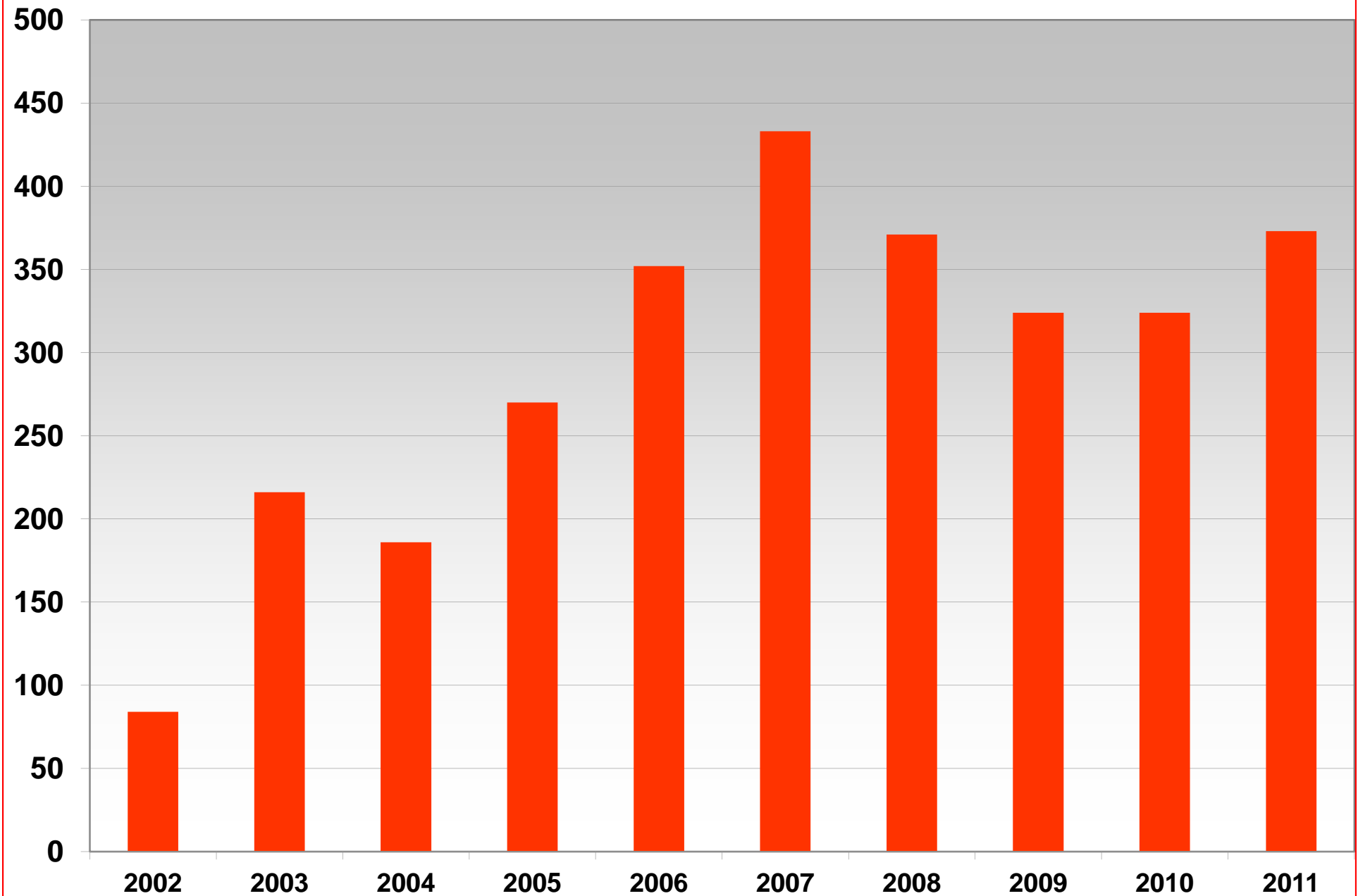
REPHY : nombre d'analyses chimiques CL-SM/SM toxines lipophiles



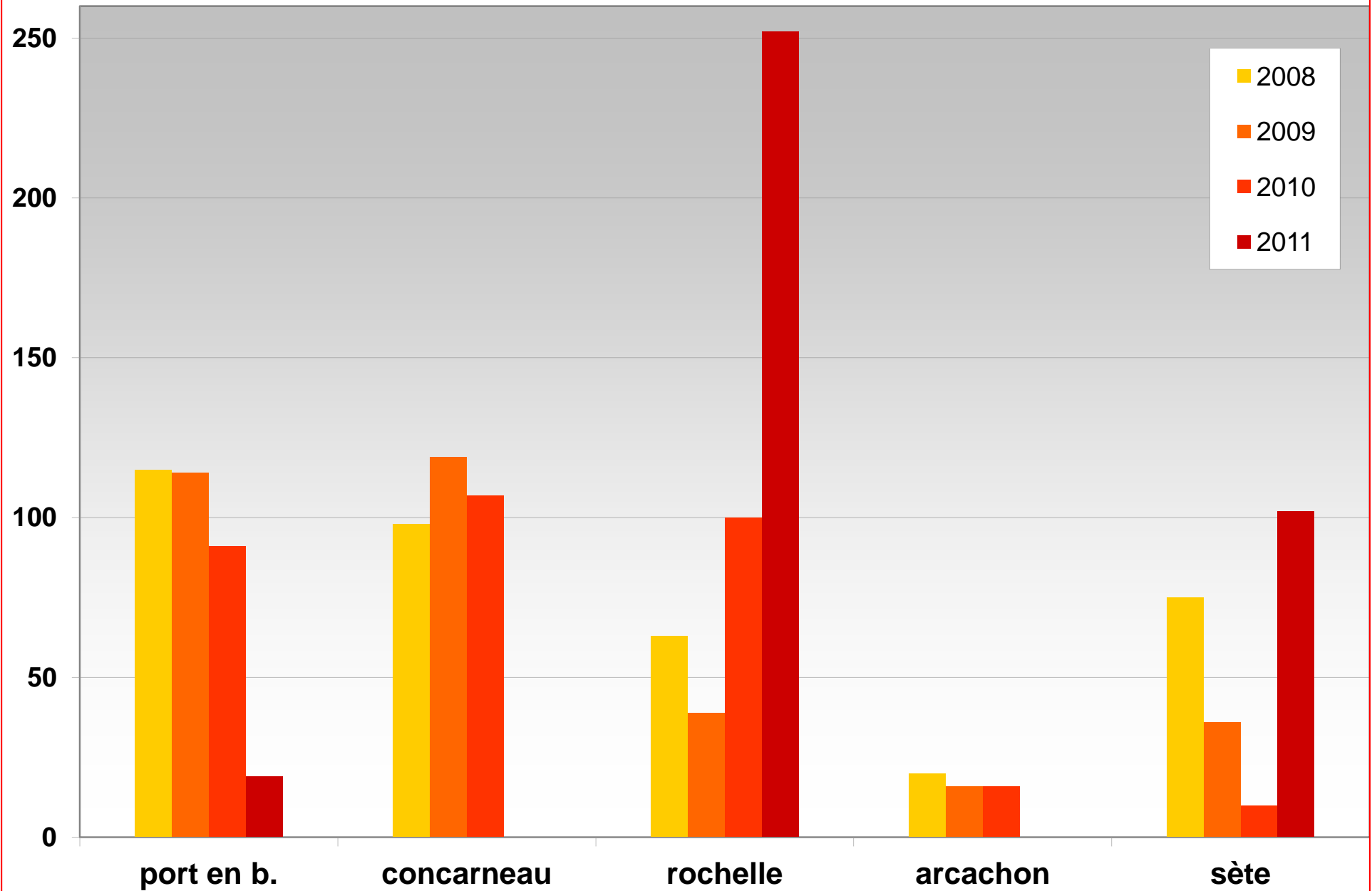
REPHY : nombre d'analyses CL-SM/SM toxines lipophiles par labo analyste



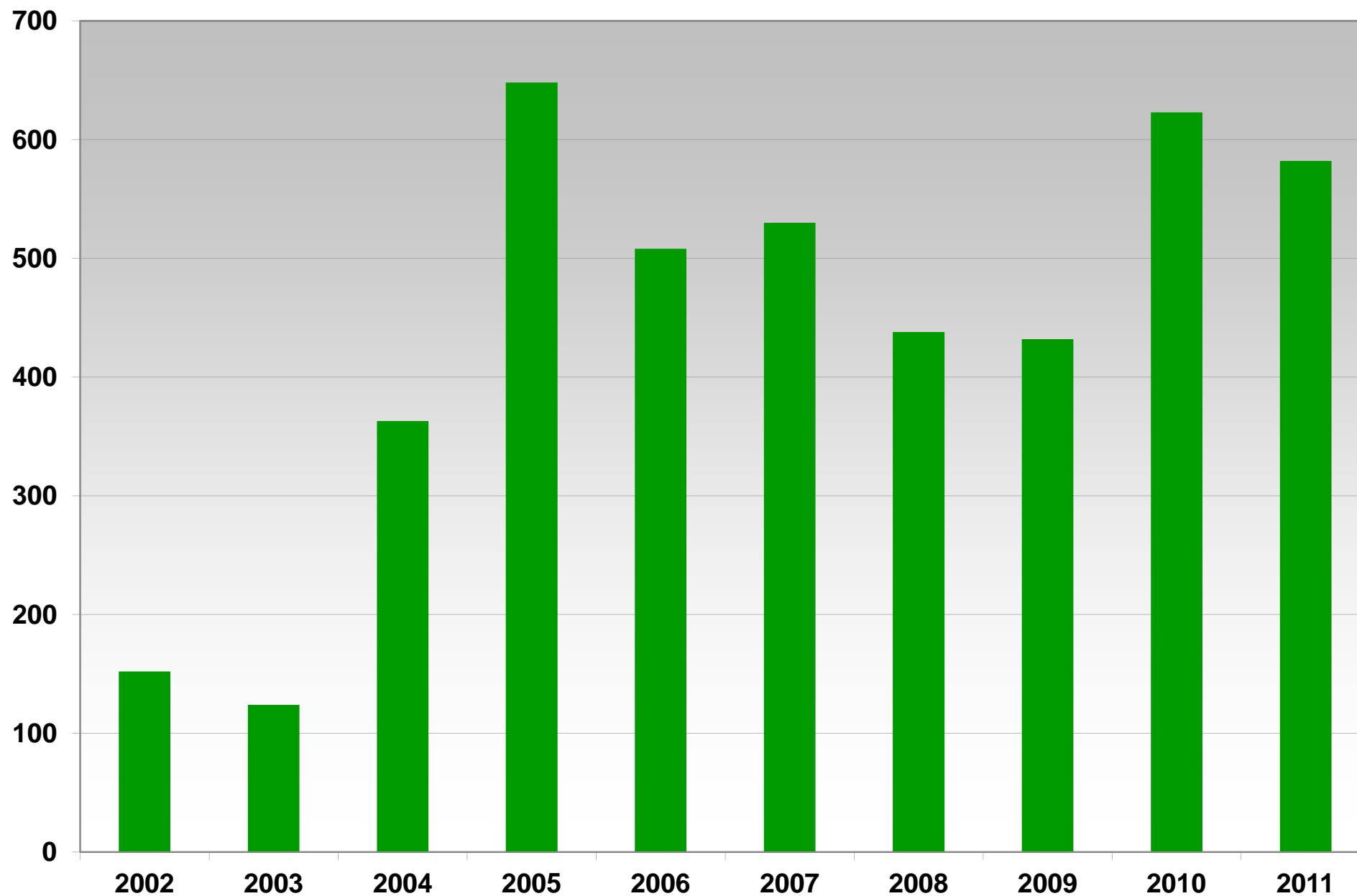
REPHY : nombre de bio-essais PSP



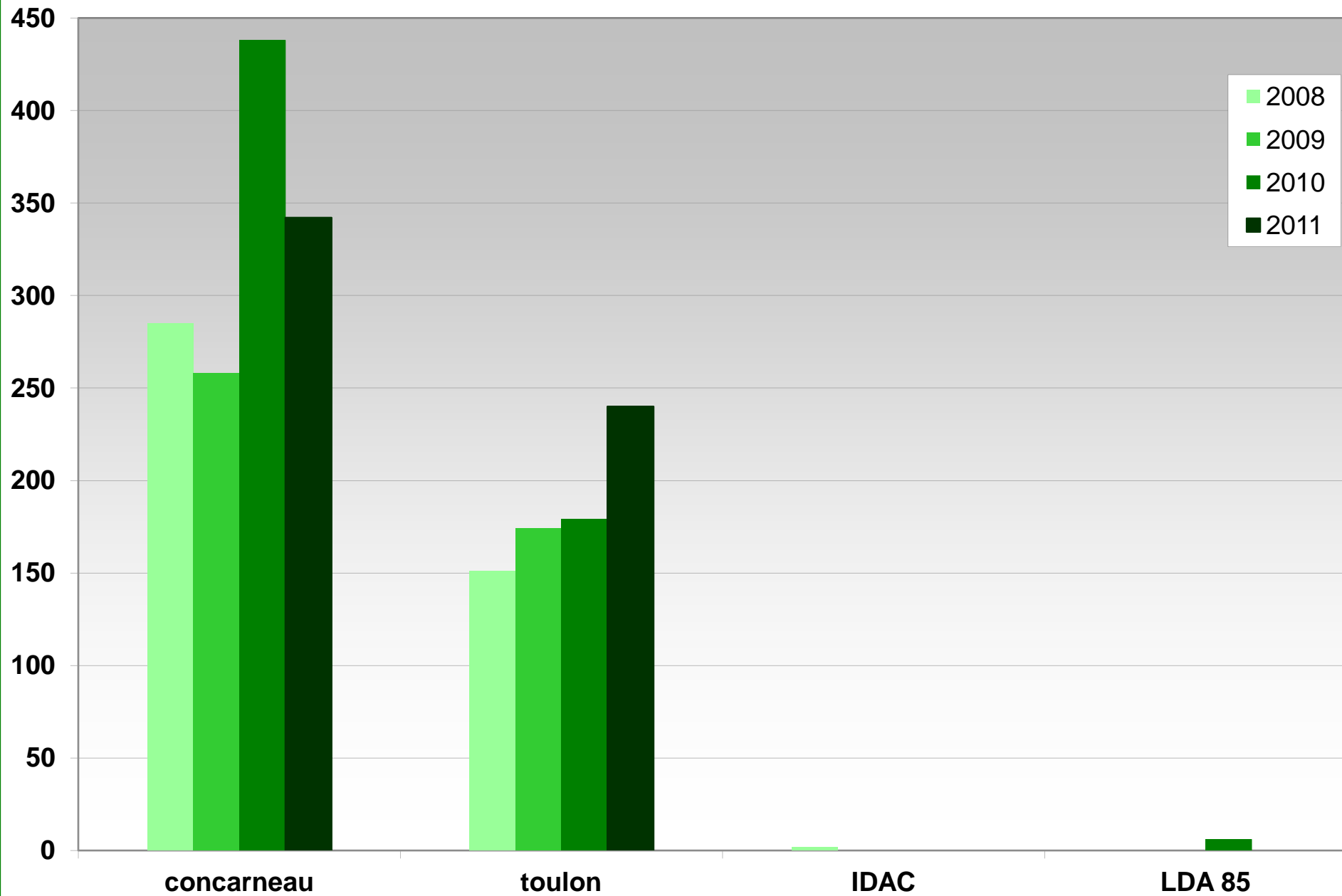
REPHY : nombre de bio-essais PSP par labo analyste



REPHY : nombre d'analyses CL/UV toxines ASP



REPHY : nombre d'analyses CL/UV toxines ASP par labo analyste





Toxines lipophiles : travaux Ifremer / PHYC

- 2009 : participation à trois études de validation pour les toxines lipophiles au niveau européen
 - organisés par le LCR Vigo, le LNR allemand et le LNR néerlandais
- Début 2010 : validation de l'analyse sur la chair totale par comparaison des résultats sur les deux matrices chair totale / glande digestive
 - selon normes AFNOR
 - approuvé par DGAL et Anses
 - mise en application REPHY au 1^{er} avril 2010 (gain de temps)

Dinophysis et toxines lipophiles

(DSP - diarrhéiques)

Dinophysis : maxima 2008

lfrermer environnement
ParamMaps

▼ **Données**

-  *Dinophysis*
-  *Alexandrium*
-  *Pseudo-nitzschia*
-  *Ostreopsis*

2004 2005 2006 2007 2008

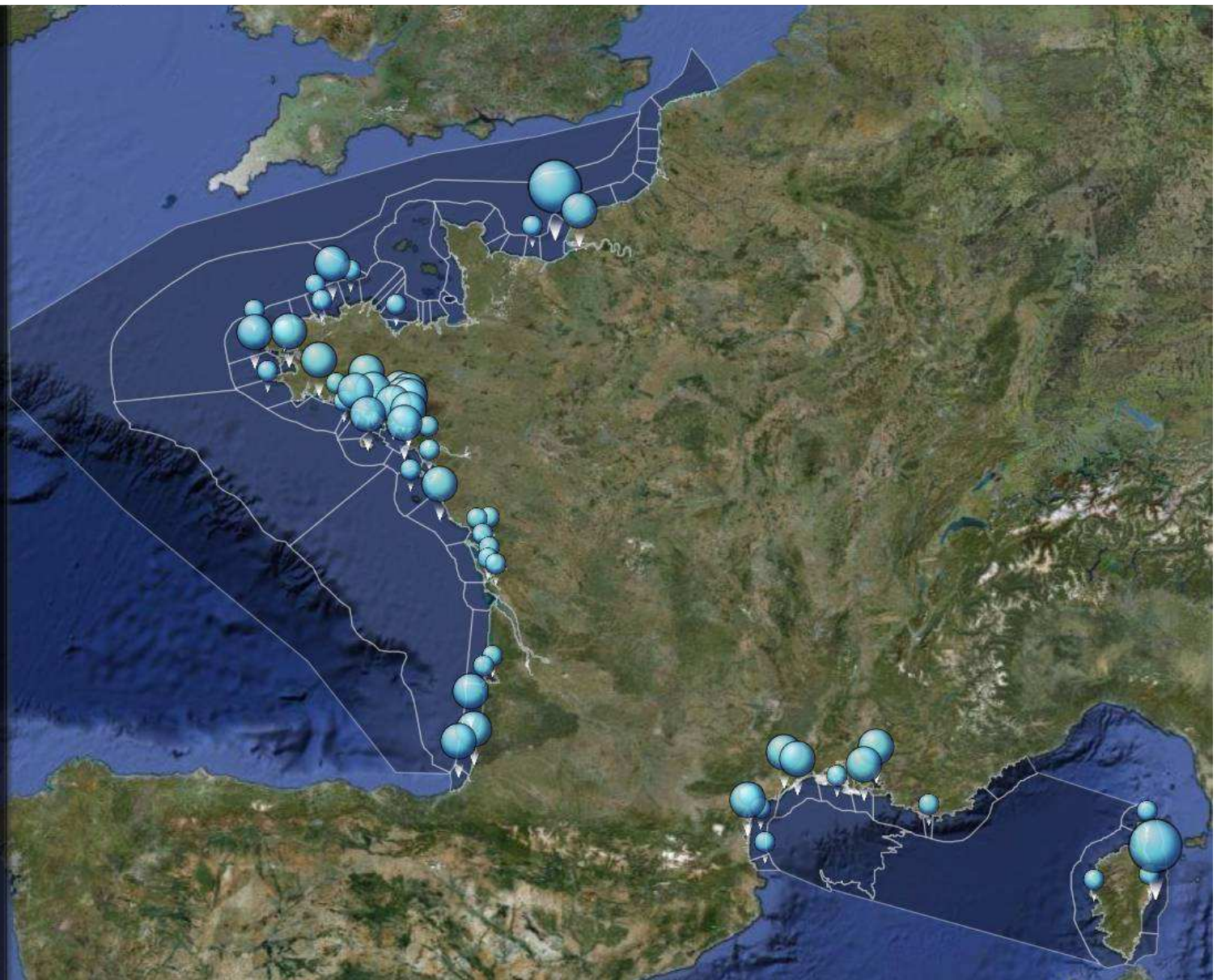
|< >|

▼ **Légende**

Concentration maximale annuelle, en nombre de cellules par litre d'eau de mer

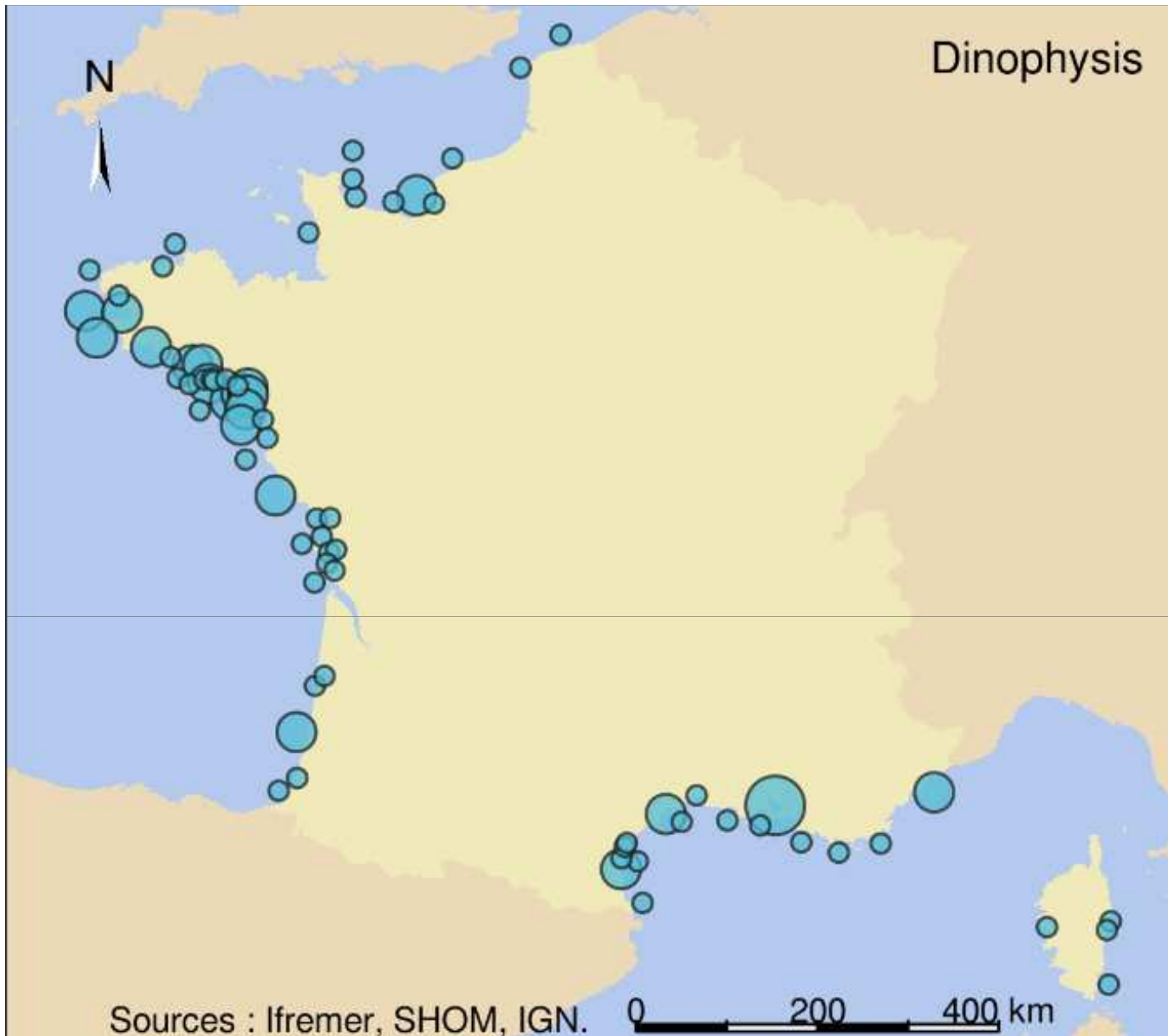
- ]0, 1 000]
- ]1 000, 10 000]
- ]10 000, 100 000]
- ]100 000, 1 000 000]
-  > 1 000 000

► **Commentaire**



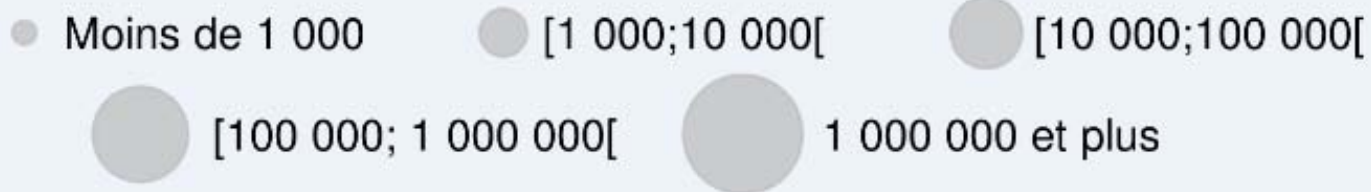
Dinophysis

2009



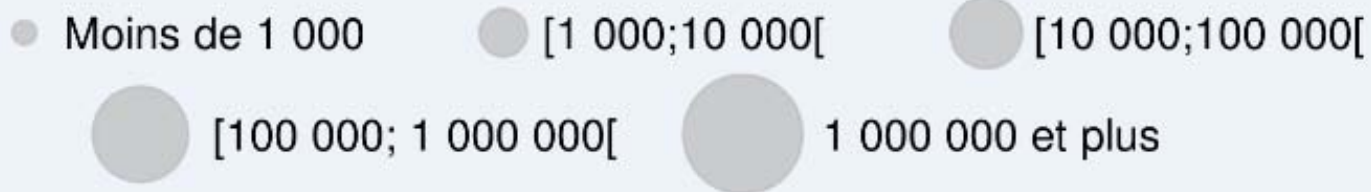
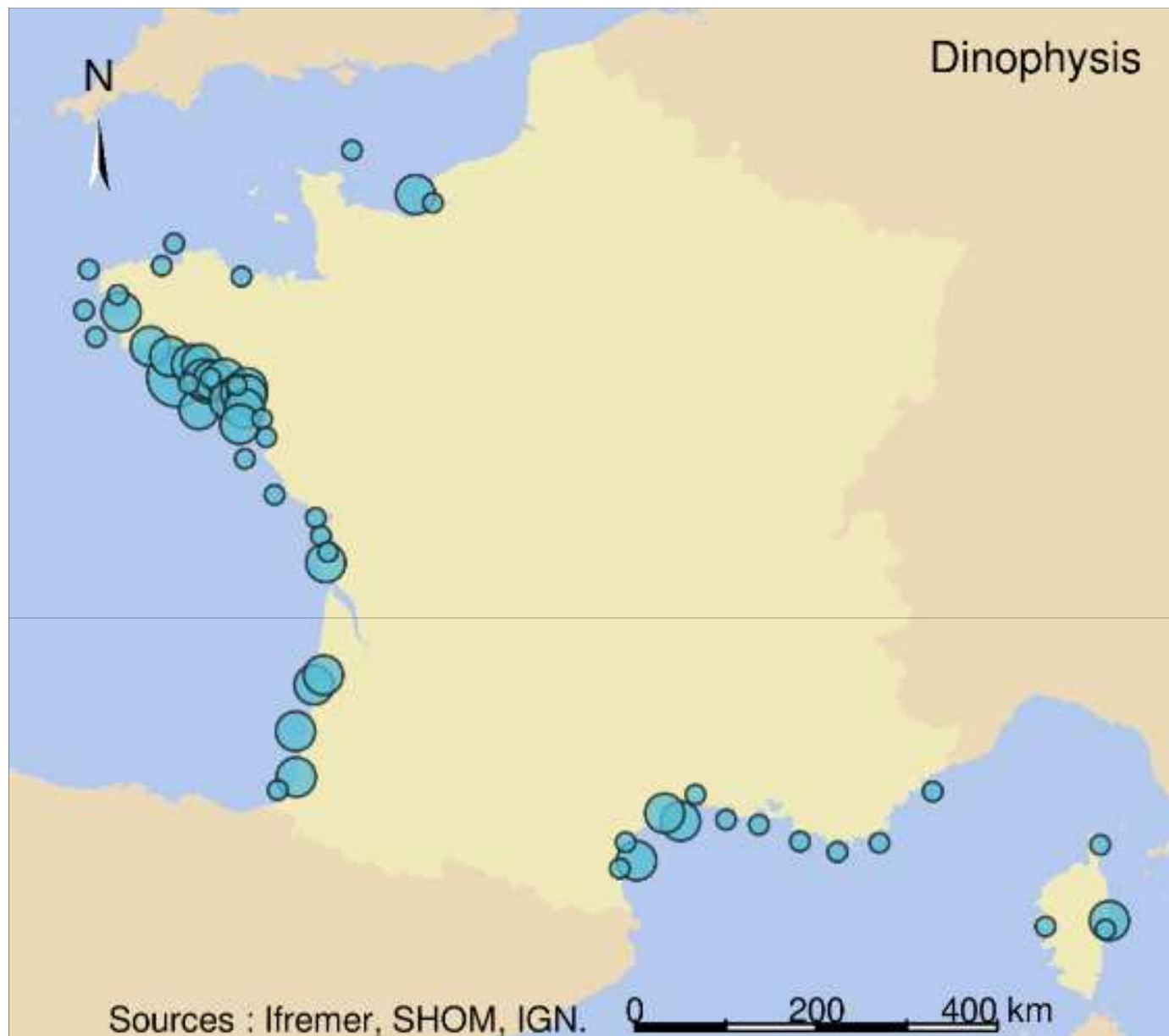
Sources : Ifremer, SHOM, IGN.

0 200 400 km



Dinophysis

2010



Dinophysis

2011



- Moins de 1 000
- [1 000;10 000[
- [10 000;100 000[
- [100 000; 1 000 000[
- 1 000 000 et plus



Dinophysis 2009 - 2011

- **Observé tous les ans**
 - en baie de Seine et Calvados, à partir de juillet-août
 - en Bretagne ouest et sud à partir de mars-avril
 - dans les lagunes Languedoc-Roussillon et Corse, toute l'année
- **Plus rarement observé**
 - sur la côte nord, dans l'ouest Cotentin, en Bretagne nord
- **Maxima annuels presque toujours < 10 000 cells/L**
- **Rarement observé en hiver en Manche-Atlantique, présent toute l'année en Méditerranée**



Toxines lipophiles : rappel stratégie

- **Gisements côtiers**
 - analyse systématique en zones à risque, pendant périodes à risque
 - hors période à risque : déclenchement par présence de *Dinophysis*
- **Gisements au large**
 - analyse systématique pendant périodes de pêche

| | jan | fev | mar | avr | mai | jun | jui | aou | sep | oct | nov | dec |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 003 | | | | | | | | | | | | |
| 010 | | | | | | | | | | | | |
| 032 | | | | | | | | | | | | |
| 037 | | | | | | | | | | | | |
| 038 | | | | | | | | | | | | |
| 039 | | | | | | | | | | | | |
| 040 | | | | | | | | | | | | |
| 042 | | | | | | | | | | | | |
| 043 | | | | | | | | | | | | |
| 044 | | | | | | | | | | | | |
| 045 | | | | | | | | | | | | |
| 046 | | | | | | | | | | | | |
| 047 | | | | | | | | | | | | |
| 048 | | | | | | | | | | | | |
| 049 | | | | | | | | | | | | |
| 051 | | | | | | | | | | | | |
| 052 | | | | | | | | | | | | |
| 053 | | | | | | | | | | | | |
| 062 | | | | | | | | | | | | |
| 063 | | | | | | | | | | | | |
| 065 | | | | | | | | | | | | |
| 066 | | | | | | | | | | | | |
| 067 | | | | | | | | | | | | |
| 068 | | | | | | | | | | | | |
| 069 | | | | | | | | | | | | |
| 072 | | | | | | | | | | | | |
| 075 | | | | | | | | | | | | |
| 084 | | | | | | | | | | | | |
| 087 | | | | | | | | | | | | |
| 088 | | | | | | | | | | | | |
| 097 | | | | | | | | | | | | |
| 099 | | | | | | | | | | | | |
| 105 | | | | | | | | | | | | |
| 118 | | | | | | | | | | | | |

Zones et périodes à risque toxines lipophiles pour 2012




Un mois est décrit à risque si des épisodes toxiques ont été observés une année sur les trois dernières années

Toxines lipophiles 2009

lframer environnement

ParamMaps

Données

-  Toxines lipophiles (DSP)
-  Toxines paralysantes (PSP)
-  Toxines amnésiantes (ASP)


2005 2006 2007 2008 2009



Légende

La présence d'un coquillage dans une zone marine signifie que le maximum annuel de toxines a dépassé le seuil sanitaire officiel (résultat positif pour un bio-essai)

-  *Mytilus* (Moule)
-  *Crassostrea gigas* (Huître creuse)
-  *Pecten maximus* (Coquille St Jacques)
-  *Donax trunculus* (Donacé)
-  *Cerastoderma edule* (Coque)

Google  200 km
100 km



DSP

2010

Maxima

(en $\mu\text{g}/\text{kg}$ d'AO+DTXs+PTXs)

Moules

Baie de Concarneau : **3311**

- moules
- huîtres
- palourdes
- pectinidés
- autres coquillages

Sources : Ifremer, SHOM, IGN.

0 200 400 km

DSP

2011

Maxima

(en $\mu\text{g}/\text{kg}$ d'AO+DTXs+PTXs)

Moules

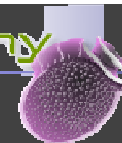
Rade de Brest : 4126

Donax

Baie de Douarnenez : 3048

- moules
- huîtres
- palourdes
- pectinidés
- autres coquillages

Sources : Ifremer, SHOM, IGN. 0 200 400 km



Toxines lipophiles recherchées

| | | |
|-------------------|----------------|-------------|
| AO-libre | YTX | GYM-A |
| AO-total | Homo-YTX | GYM-B |
| DTX-2-libre | 45-OH-YTX | PTX-2sa |
| DTX-2-total | 45-OH-homo-YTX | PTX-2sa-épi |
| DTX-1-libre | YTXs-TEFs | PTX-6 |
| DTX-1-total | COOH-YTX | SPX-desMe-C |
| PTX-1 | COOH-homo-YTX | SPX-A |
| PTX-2 | AZA-1 | SPX-desMe-D |
| AO+DTXs+PTXs-TEFs | AZA-2 | SPX-B |
| | AZA-3 | SPX-C |
| | AZAs-TEFs | SPX-D |



AZA – Azaspiracides – max annuels (seuil = 160 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

| | 2010 | 2011 |
|------------------------------|------|------|
| 038 - Iroise - Camaret | 21 | 45 |
| 045 - Rivière de Pont L'Abbé | | 17 |



YTX – Yessotoxines – max annuels (seuil = 1000 µg/kg)

| | 2010 | 2011 | | 2010 | 2011 |
|----------------------------------|------|------|------------------------------|------|------|
| 039 - Rade de Brest | | 30 | 063 - Baie de Vilaine - côte | 40 | |
| 044 – Bénodet | 25 | 47 | 065 - Estuaire de la Vilaine | 40 | |
| 045 - Rivière de Pont L'Abbé | | 25 | 066 - Pen Bé | 36 | |
| 046 - Odet | 21 | 45 | 068 - Traicts du Croisic | 61 | 15 |
| 047 - Baie de Concarneau | 244 | 58 | 072 - Vendée Nord | 15 | |
| 048 - Aven - Belon - Laïta | 26 | 13 | 080 - Marennes Oléron | | 38 |
| 049 - Rade de Lorient - Groix | 335 | 125 | 087 - Arcachon aval | 38 | 305 |
| 051 - Petite mer de Gâvres | 123 | | 088 - Bassin d'Arcachon | | 151 |
| 053 - Rivière d'Etel | 77 | | 105 - Etangs Palavasiens | 12 | 105 |
| 054 - Belle-Ile - Houat - Hoëdic | 29 | 68 | 112 - Rade de Toulon | 22 | |
| 058 - Golfe du Morbihan - large | 30 | | 118 - Etang de Diana | 146 | 115 |
| 062 - Baie de Vilaine - large | | 23 | 119 - Etang d'Urbino | | 34 |

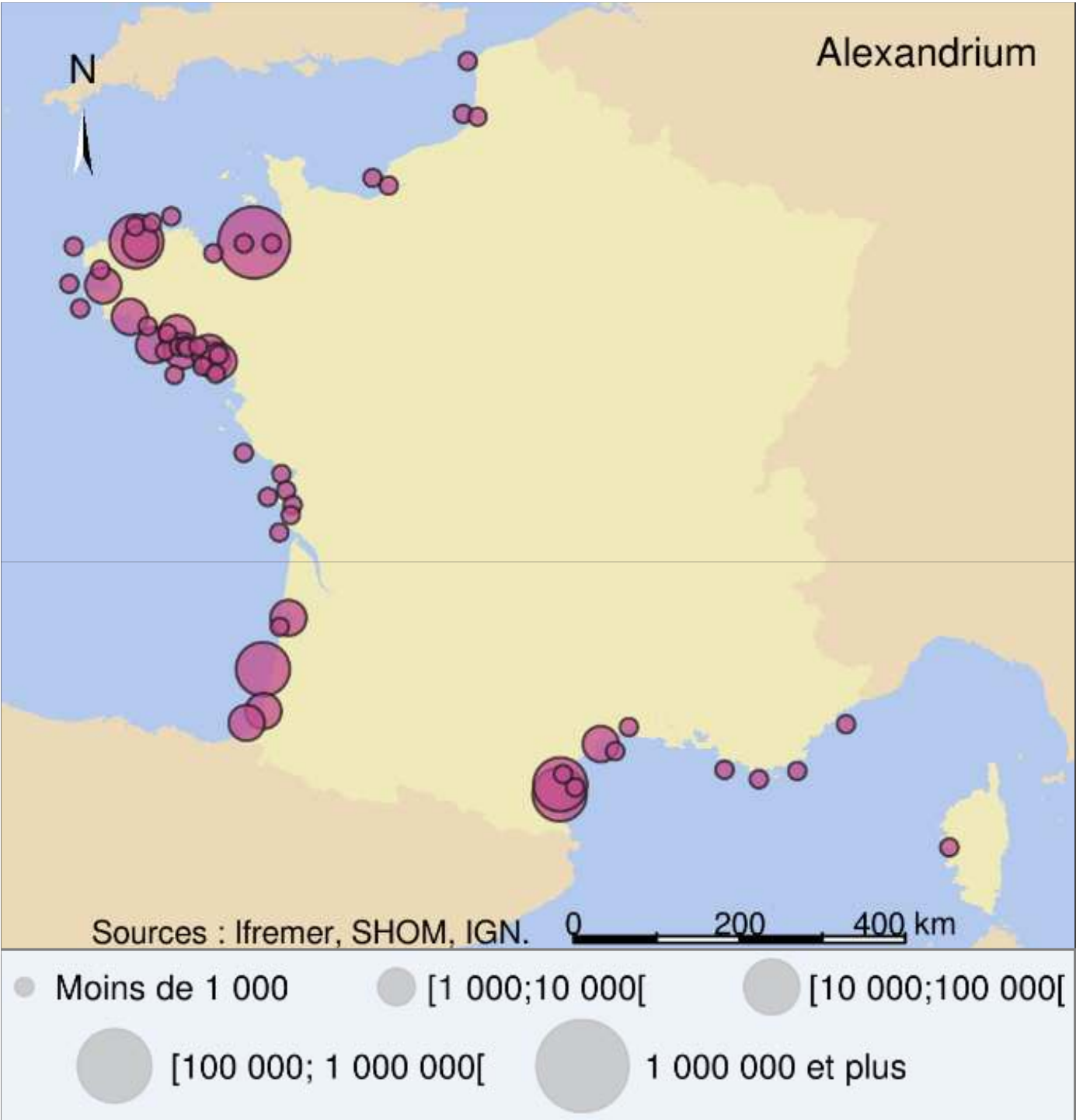


Autres toxines – max annuels nationaux

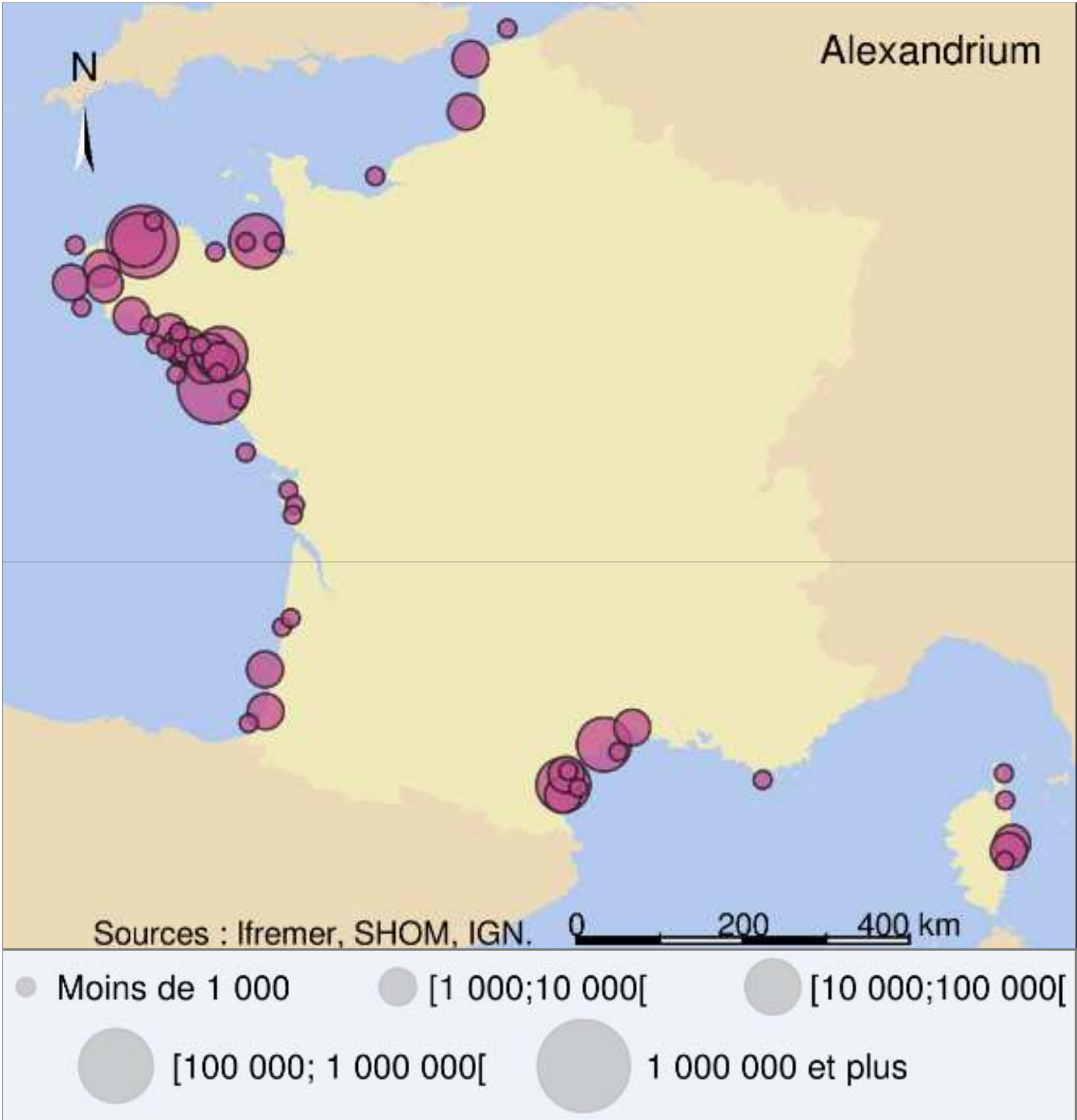
| | 2010 | 2011 |
|-------------|------|------|
| GYM-A | 24 | 15 |
| GYM-B | 2 | 15 |
| SPX-desMe-C | 61 | 41 |
| SPX-A | 14 | 13 |
| SPX-desMe-D | 18 | 10 |
| SPX-B | 2 | 10 |
| SPX-C | 31 | 15 |
| SPX-D | 21 | 12 |

Alexandrium et
toxines paralysantes (PSP)

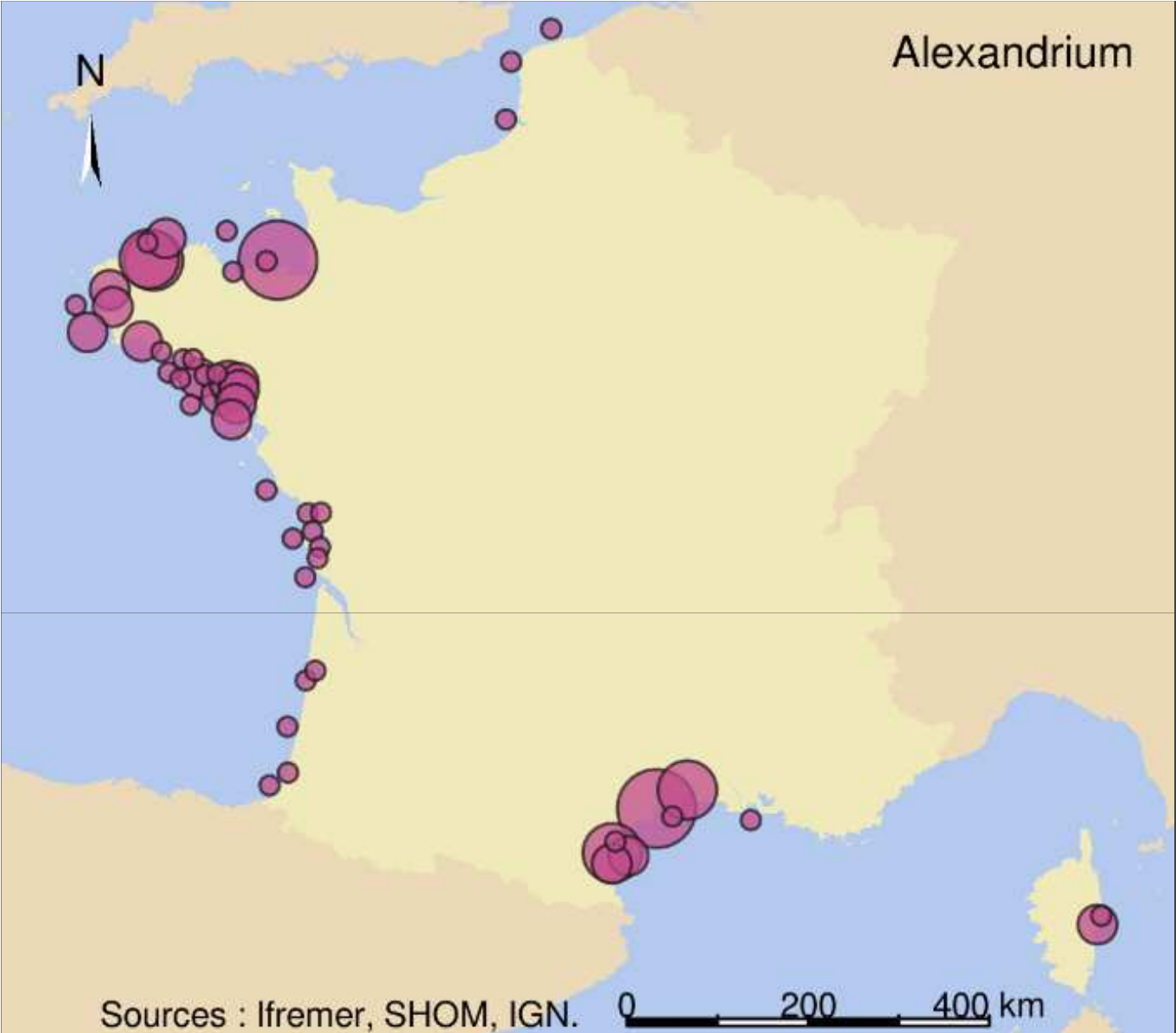
2009



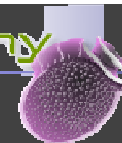
2010



2011



- Moins de 1 000
- [1 000;10 000[
- [10 000;100 000[
- [100 000; 1 000 000[
- 1 000 000 et plus



Alexandrium 2009 - 2011

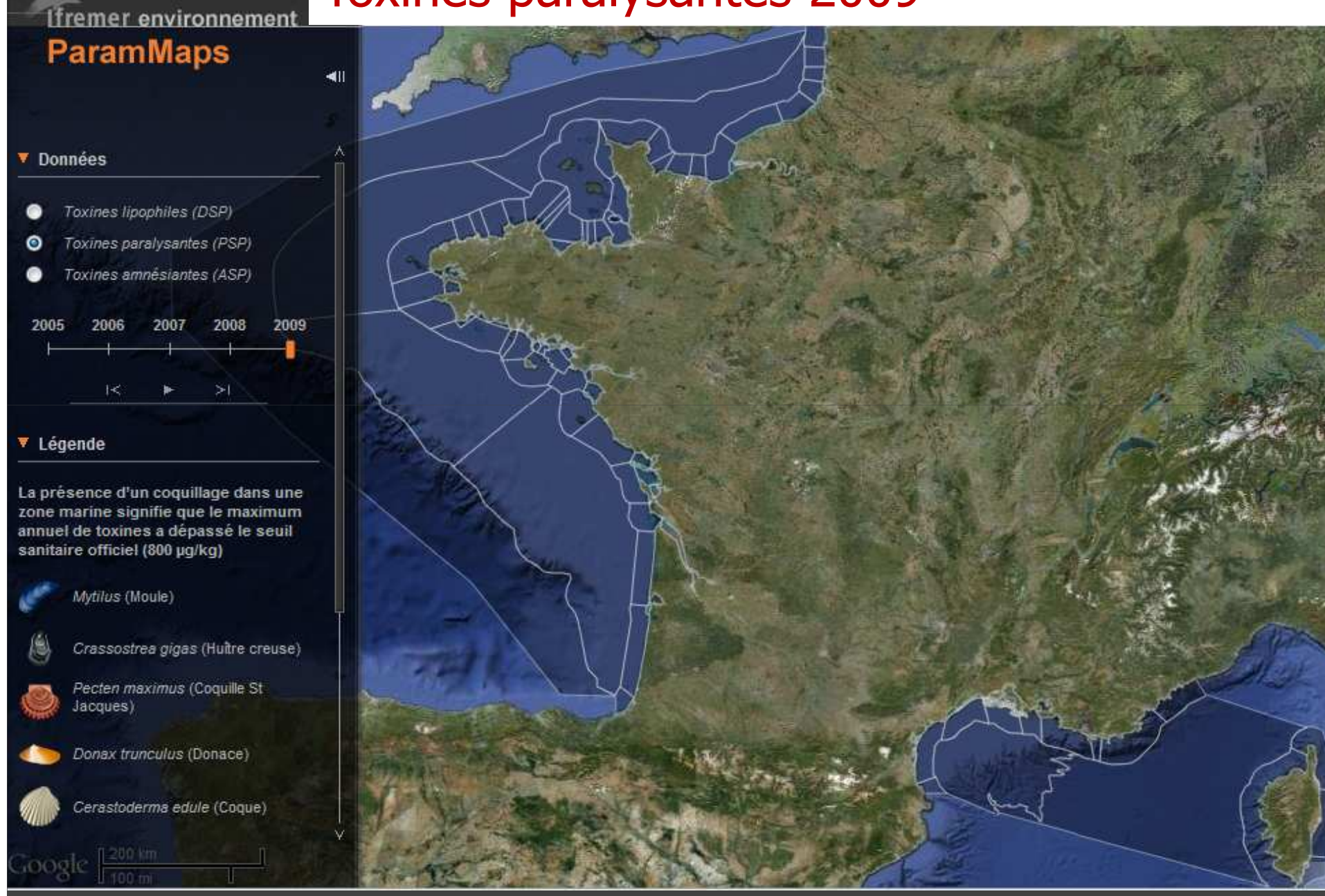
- Observé tous les ans sur tout le littoral français
- Maxima annuels généralement $< 100\ 000$ cells/L
 - blooms $> 100\ 000$ cells/L observés en Rance, baie de Morlaix, au large de la Loire, et dans l'étang de Thau
- Principalement observé en été en Manche-Atlantique, en automne-hiver en Méditerranée



Toxines PSP : rappel stratégie

- **Gisements côtiers**
 - présence d'*Alexandrium* > seuil d'alerte → déclenchement recherche de toxines PSP
- **Gisements au large**
 - analyse systématique pendant périodes de pêche

Toxines paralysantes 2009



PSP

2010

Maxima

(en $\mu\text{g} / \text{kg}$ d'équ. STX)

Coques

Rance : 2700

Moules

Rivière de Morlaix : 2880

- moules
- huîtres
- palourdes
- pectinidés
- autres coquillages

Sources : Ifremer, SHOM, IGN. 0 200 400 km

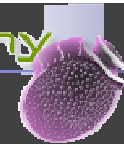
2011

PSP

N

- moules
- huîtres
- palourdes
- pectinidés
- autres coquillages

Sources : Ifremer, SHOM, IGN. 0 200 400 km



Et 2012.....



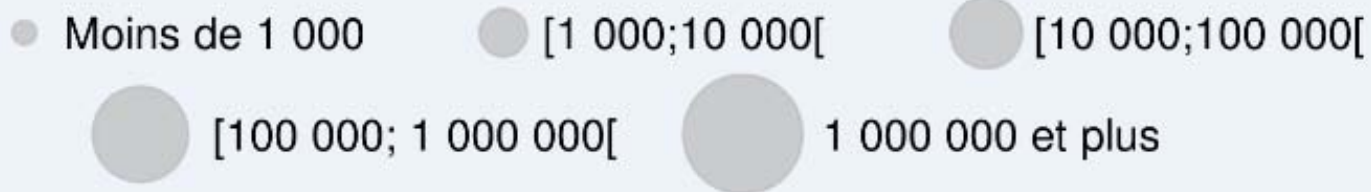
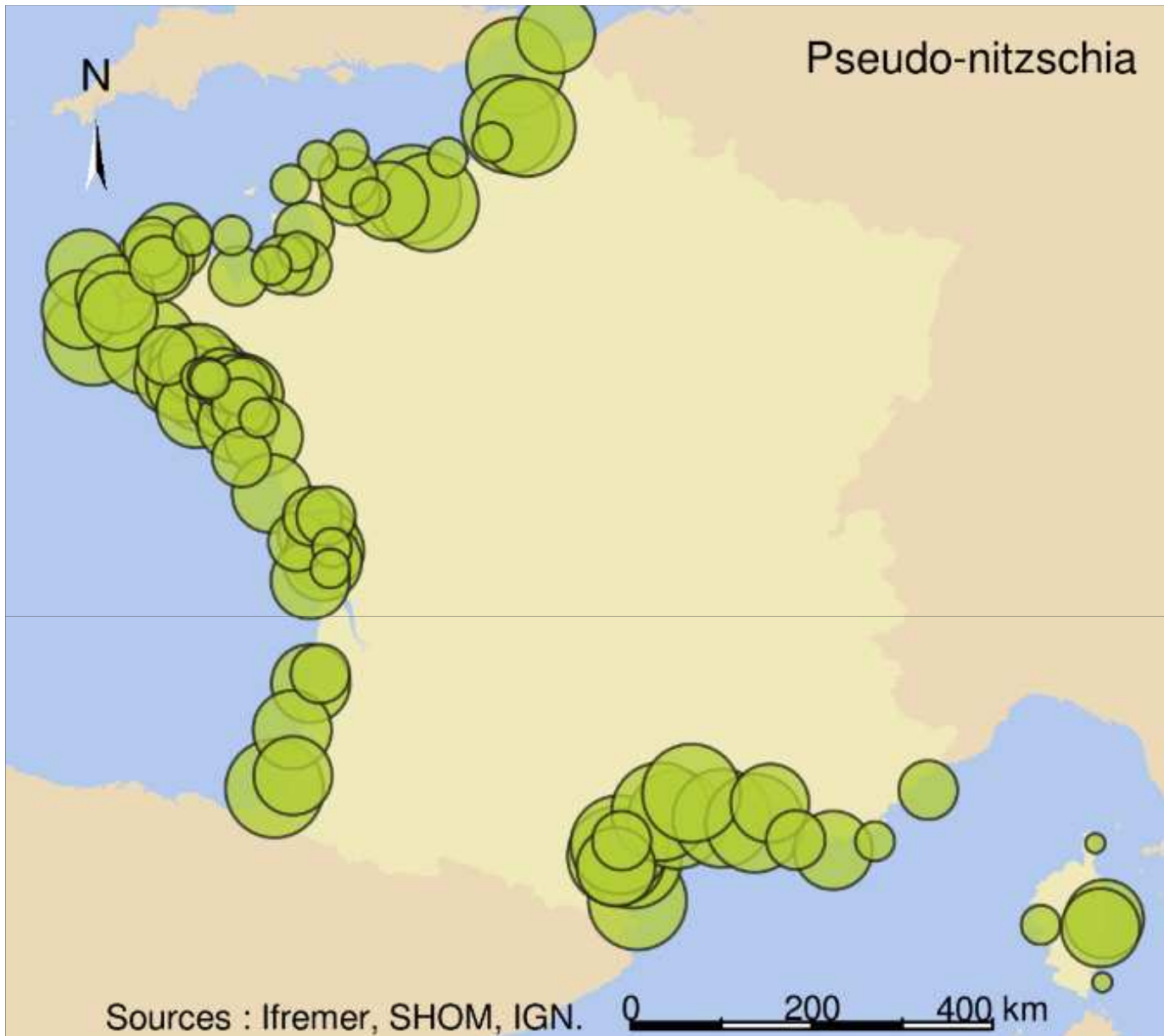
Carte 3°: Surveillance de la Rade de Brest - semaine 28 (8 au 14 juillet 2012)

Carte LER/Concarneau

Pseudo-nitzschia et
toxines amnésiantes (ASP)

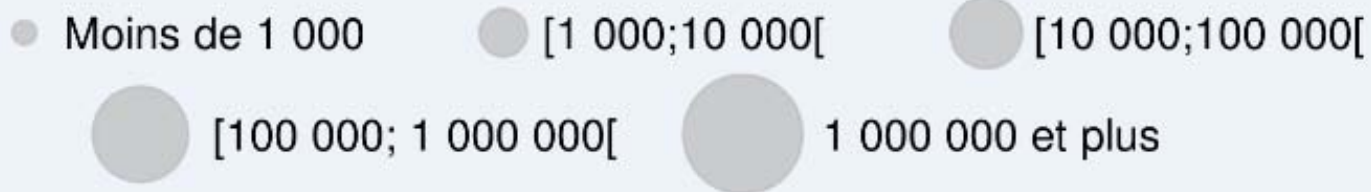
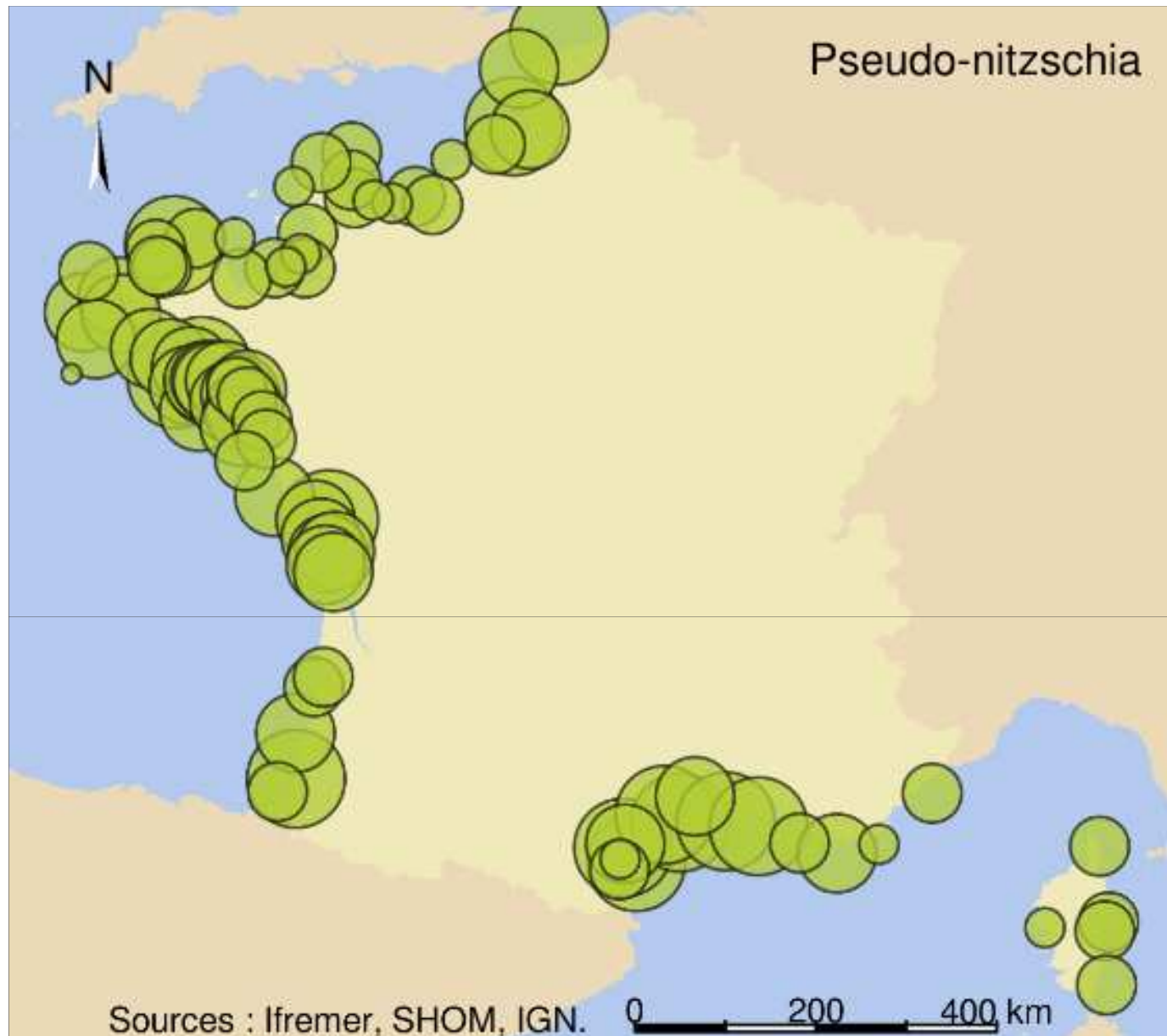
Pseudo-nitzschia

2009



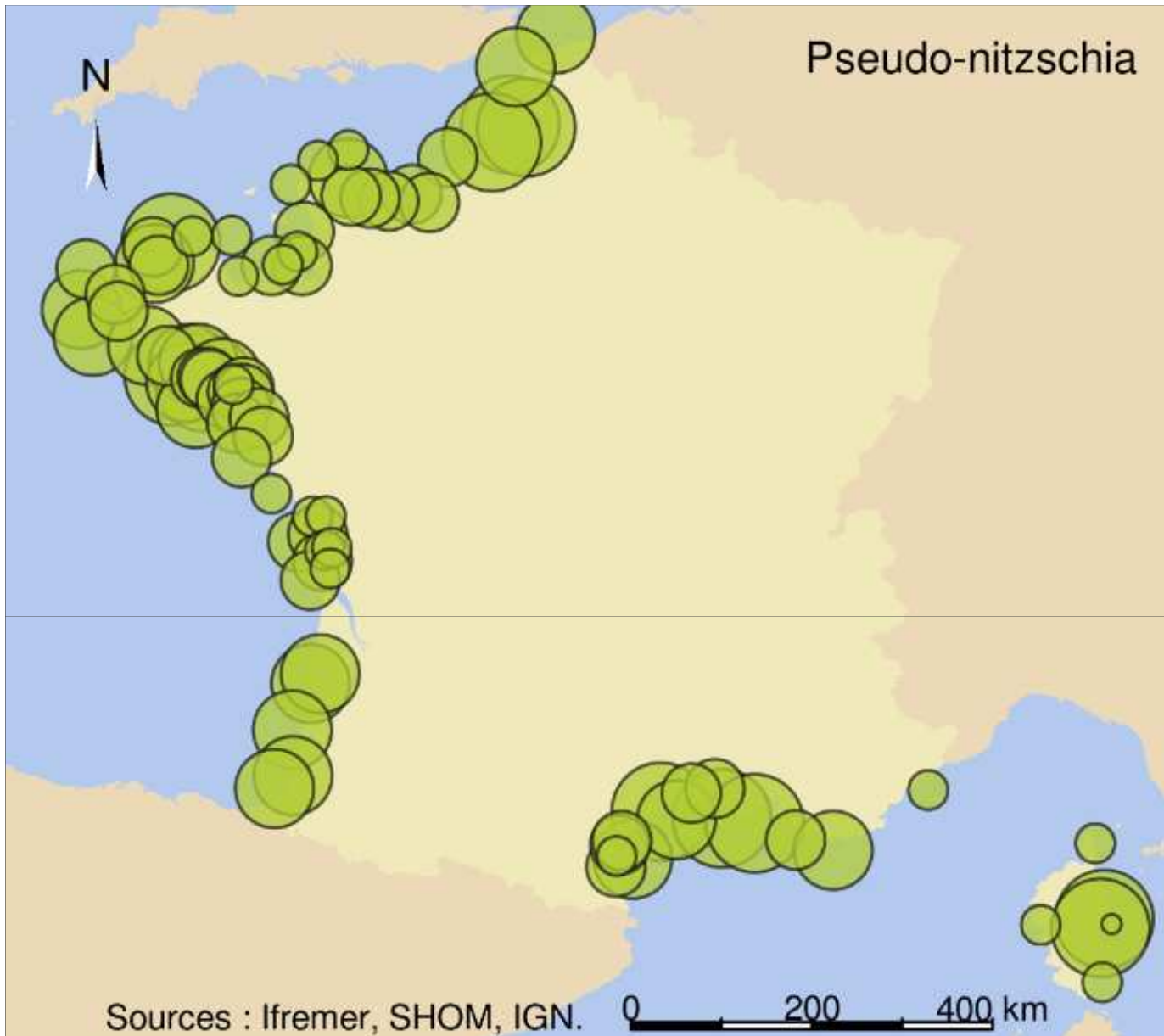
Pseudo-nitzschia

2010



Pseudo-nitzschia

2011



- Moins de 1 000
- [1 000;10 000[
- [10 000;100 000[
- [100 000; 1 000 000[
- 1 000 000 et plus



Pseudo-nitzschia : conclusion

- Observé tous les ans sur tout le littoral français, en concentrations importantes
- Maxima annuels toujours $> 100\ 000$ cells/L, souvent > 1 million
- Périodes de blooms principalement entre avril et juin dans toutes les régions



Toxines ASP : rappel stratégie

- **Gisements côtiers**
 - présence de *Pseudo-nitzschia* > seuil d'alerte → déclenchement recherche de toxines ASP
- **Gisements au large**
 - analyse systématique pendant périodes de pêche

Toxines amnésiantes 2009

lfrémer environnement

ParamMaps

Données

- Toxines lipophiles (DSP)
- Toxines paralysantes (PSP)
- Toxines amnésiantes (ASP)

2005 2006 2007 2008 2009

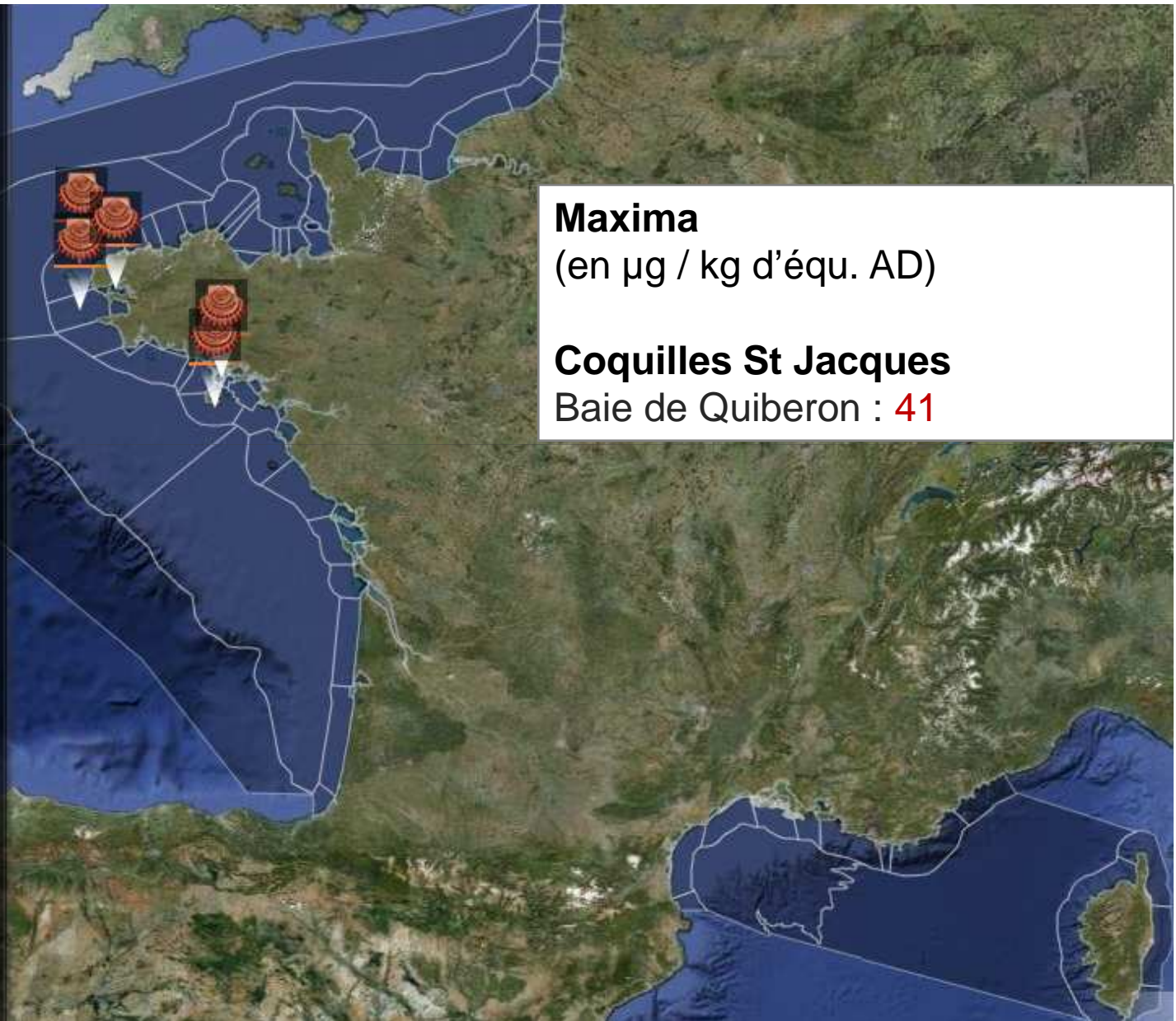
|< >|

Légende

La présence d'un coquillage dans une zone marine signifie que le maximum annuel de toxines a dépassé le seuil sanitaire officiel (20 mg/kg)

-  *Mytilus* (Moule)
-  *Crassostrea gigas* (Huître creuse)
-  *Pecten maximus* (Coquille St Jacques)
-  *Donax trunculus* (Donace)
-  *Cerastoderma edule* (Coque)

Google | 200 km | 100 mi



ASP

2010

Maxima

(en $\mu\text{g} / \text{kg}$ d'équ. AD)

Coquilles St Jacques

Baie de Vilaine large : 484

Moules

Pertuis d'Antioche : 176

Palourdes

Rivière d'Etel : 123

- moules
- huîtres
- palourdes
- pectinidés
- autres coquillages

Sources : Ifremer, SHOM, IGN. 0 200 400 km

ASP

2011

Maxima

(en μg / kg d'équ. AD)

Coquilles St Jacques

Belle île: 240

- moules
- huîtres
- palourdes
- pectinidés
- autres coquillages

Sources : Ifremer, SHOM, IGN. 0 200 400 km

Toxines lipophiles, PSP et ASP

Evolution depuis 15 ans

Synoptique toxines lipophiles 1995 - 2009

Manche

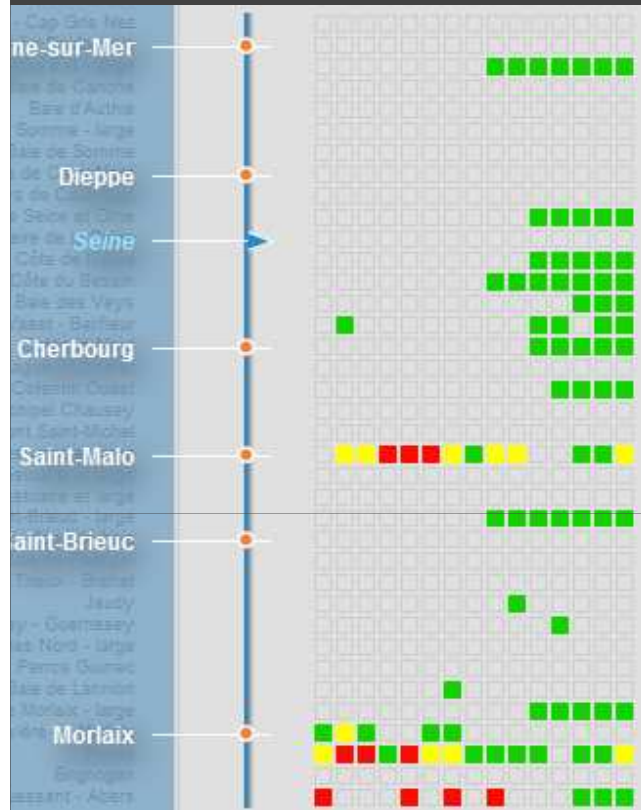
Atlantique

Méditerranée

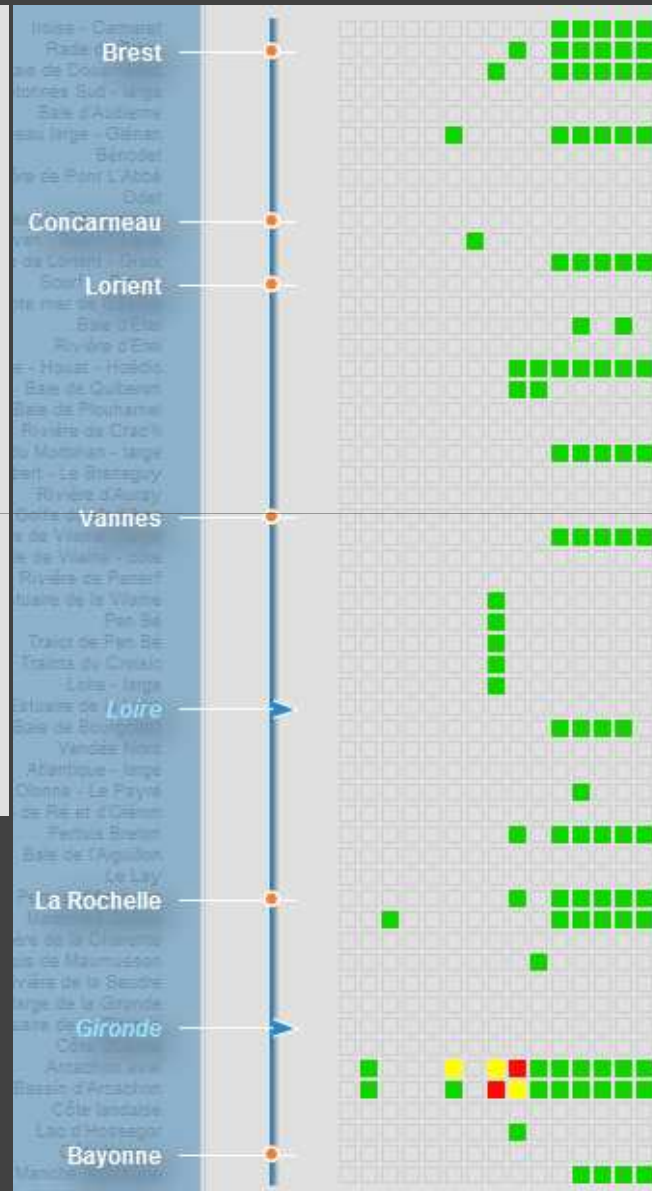


Synoptique toxines paralysantes 1995 - 2009

Manche



Atlantique



Méditerranée

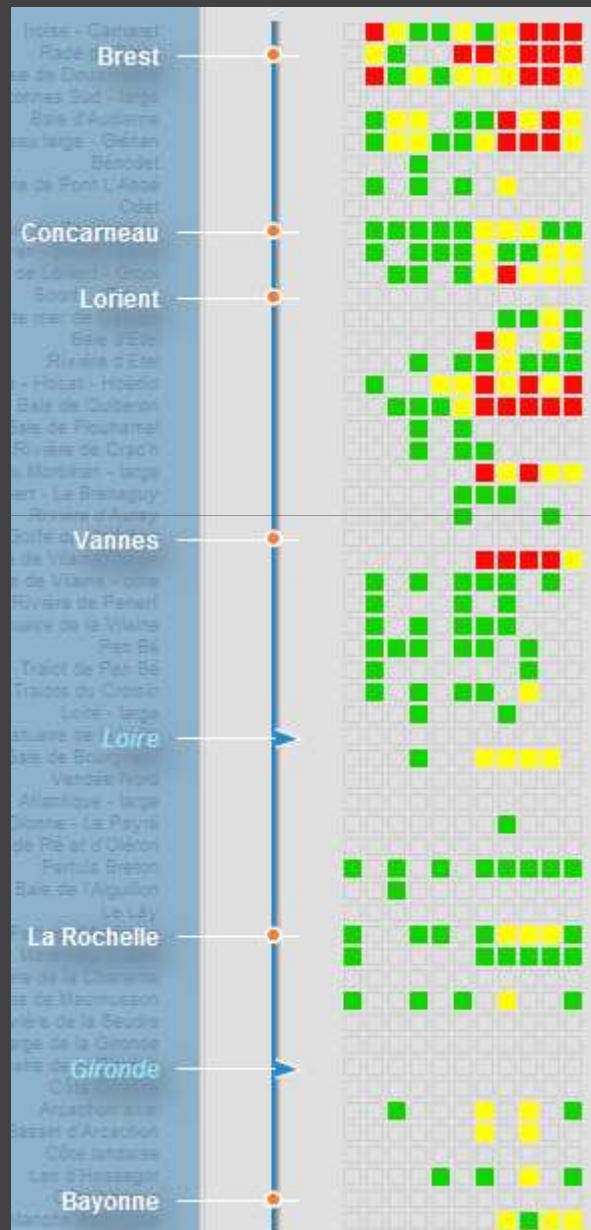


Synoptique toxines amnésiantes 1999 - 2009

Manche

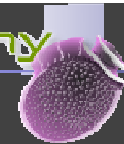


Atlantique



Méditerranée





Conclusion

- Programmation 2013 assez similaire à celle de 2012
- Le REPHY est formaté pour s'adapter à de nouveaux événements

Dynamique spatio-temporelle des peuplements de *Pseudo-nitzschia* en Bretagne

Raffaele Siano et collaborateurs
Ifremer, Brest et Concarneau

Dynamique spatio-temporelle des peuplements de *Pseudo-nitzschia* en Bretagne

(1) R. Siano, E. Ducasse, J. Quéré, D. Delmas, M. Lunven, A. Devez, A. Youenou

(2) C. Dreanno, V. Le Roy, C. Noyer

(3) E. Nezan, J. Gouriou, A. Terre- Terrillon, A. Doner



(1) Centre de Brest – Dyneco/Pelagos - Plouzané

(2) Service Interfaces et Capteurs - Plouzané

(3) LER/FBN - Concarneau

Journées REPHY – Nantes 26-27 Septembre 2012

Les toxines amnésiantes en Bretagne

■ Toxines non détectées

■ Toxines < au seuil sanitaire

■ Toxines > au seuil sanitaire = 20 mg/kg



- Contaminations qui perdurent plusieurs mois

- Pertes économiques importantes

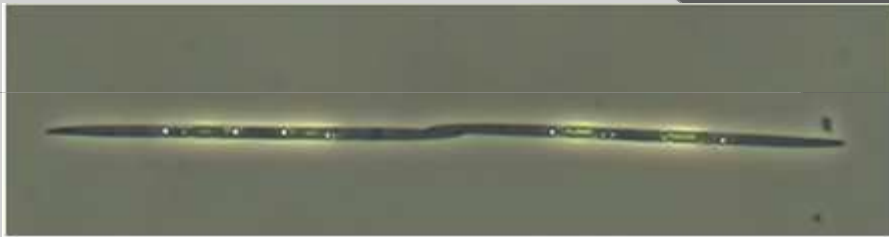


L'identification de *Pseudo-nitzschia* spp.

Dans le cadre de
la surveillance REPHY

2 grands groupes morphologiques
distinguables en microscopie
optique :

P. delicatissima complex

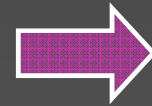


< 3 µm

P. seriata complex

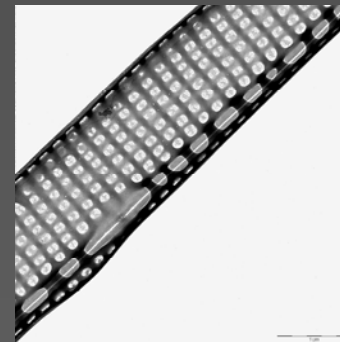


> 3 µm

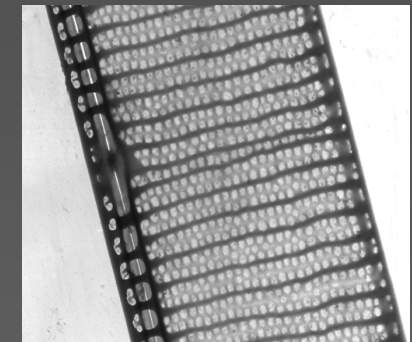


Espèces distinguables en
microscopie électronique !

P. pseudodelicatissima



P. fraudulenta



Ou

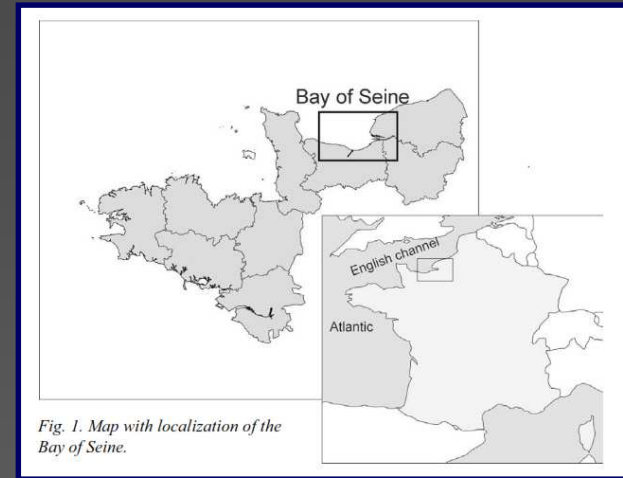
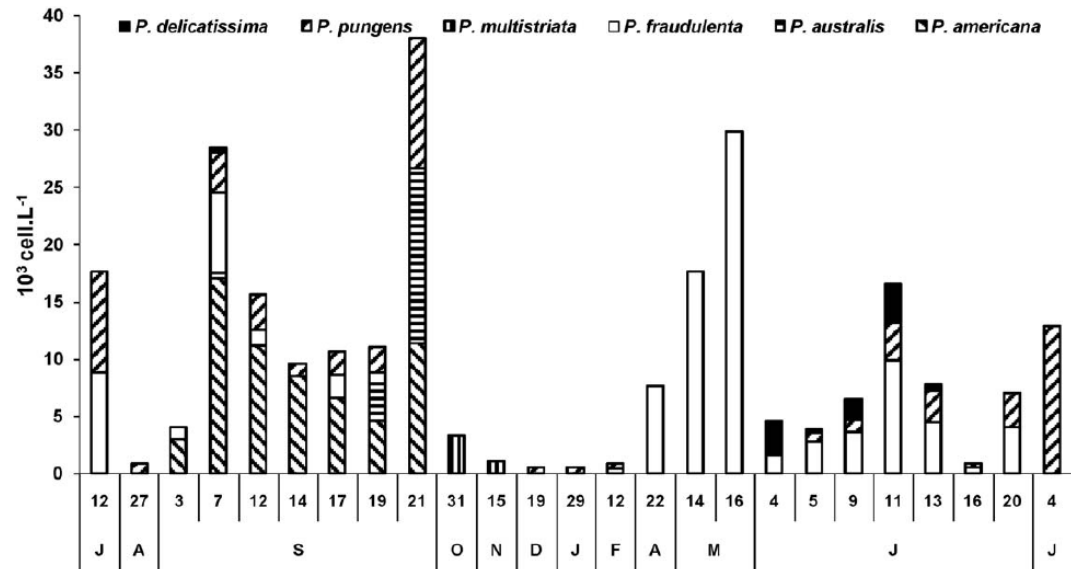
avec des méthodes
génétiques



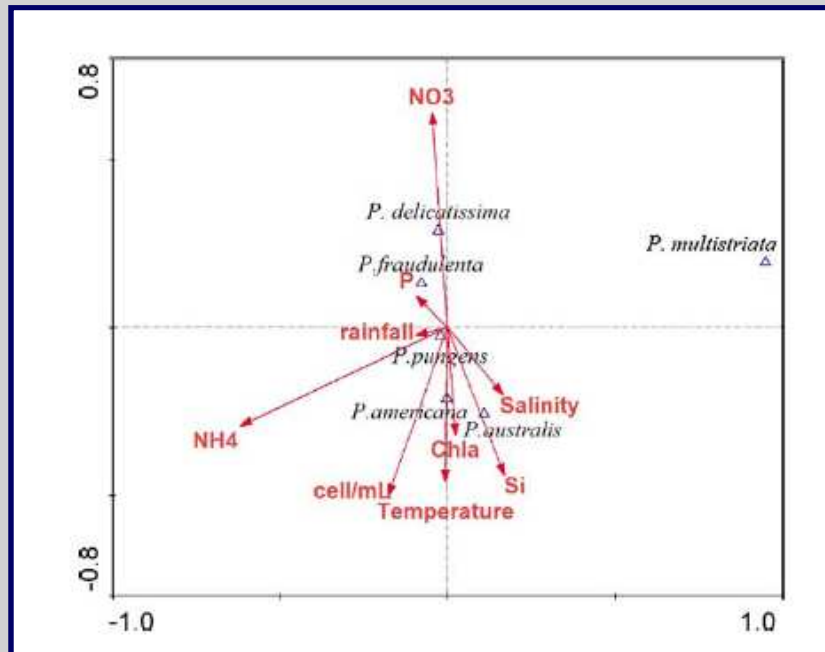
BIOLOGIE MOLECULAIRE

- Pyroséquençage - PCR
- ARISA
- T-RFLP
- qPCR
- FISH

Pourquoi identifier les espèces ?



(Klein et al., 2010)

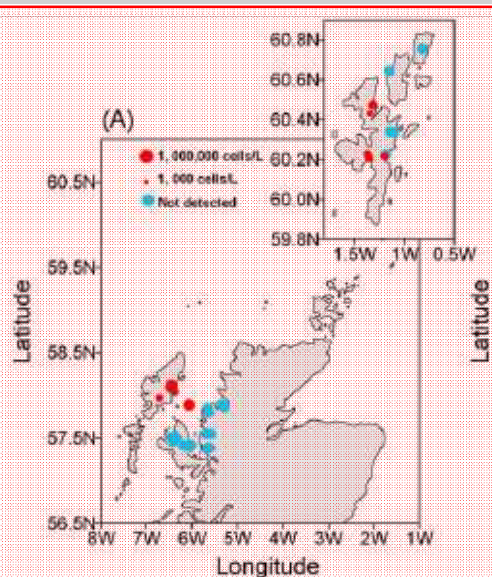
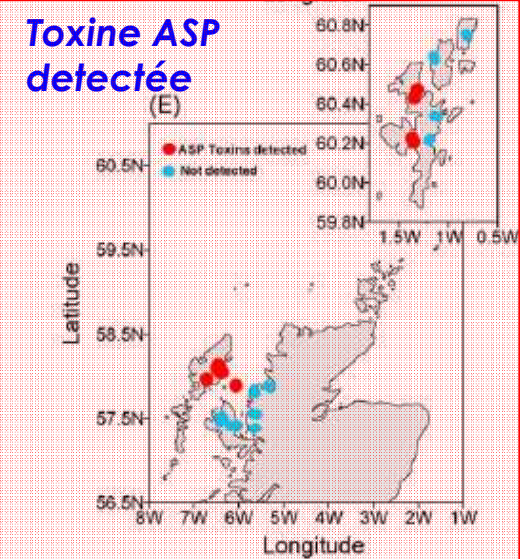
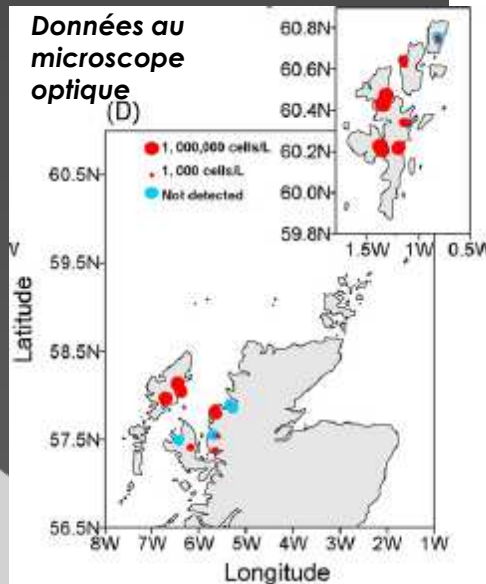


- Les espèces ne sont pas ubiquitaires
- Elles ont des saisonnalités différentes
- Leur importance relative varie très rapidement
- Elles répondent différemment aux variables environnementales

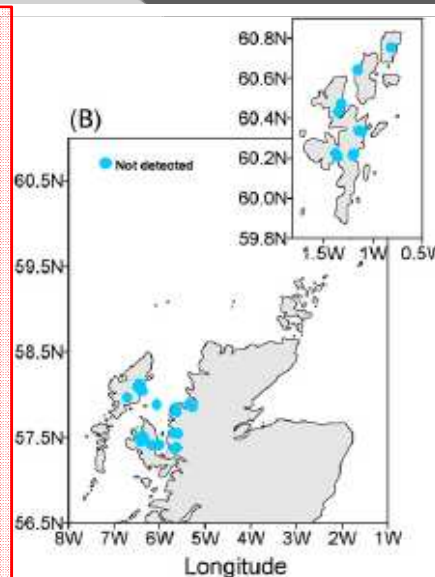
Pourquoi identifier les espèces ?

Nous pouvons associer
une espèce à un
évènement toxique

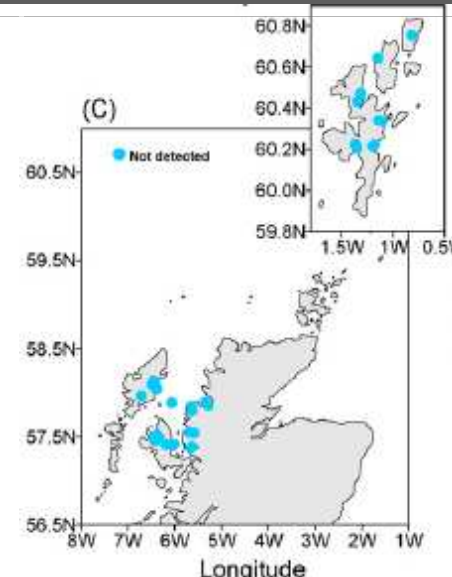
Méthode:
Fluorescent In Situ
Hybridization



Sondes: *P. australis*



P. fraudulenta

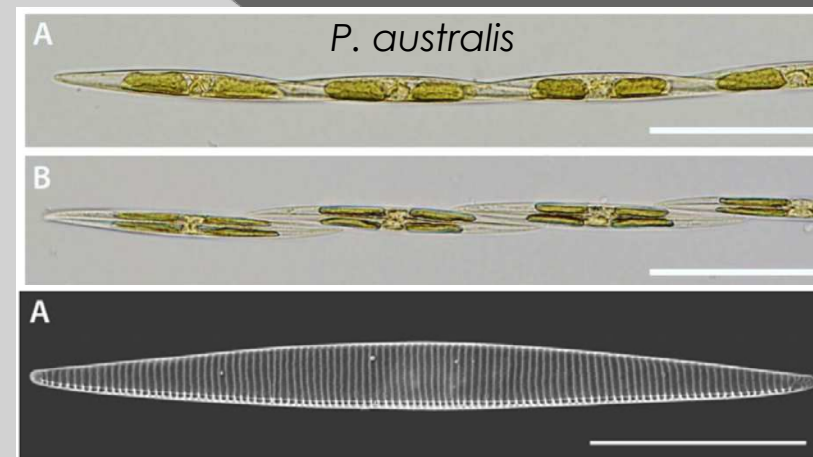
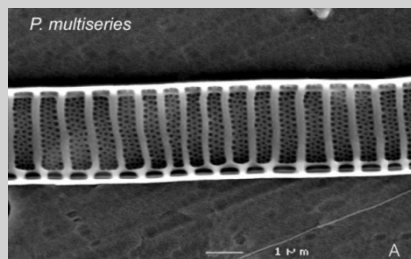
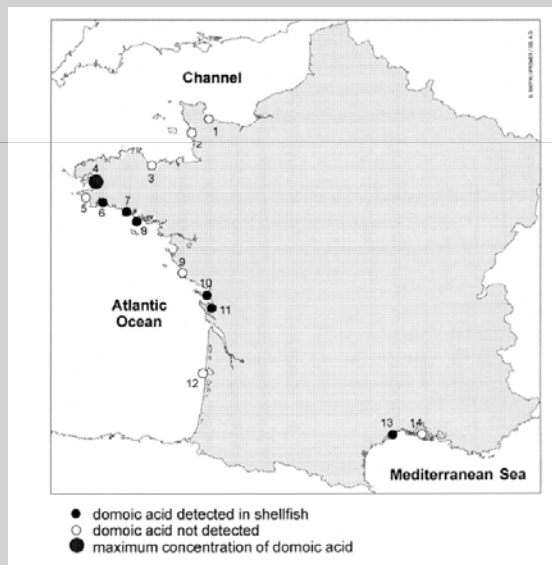
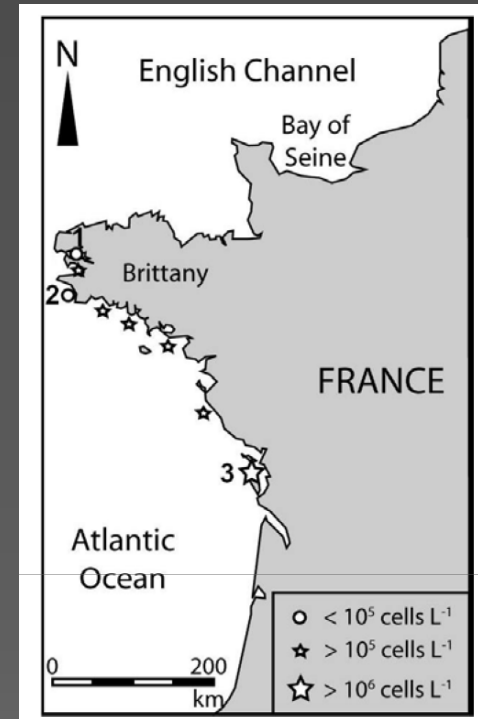


P. delicatissima (deD1)

(Turrell et al., 2008)

Contamination et espèces en Bretagne

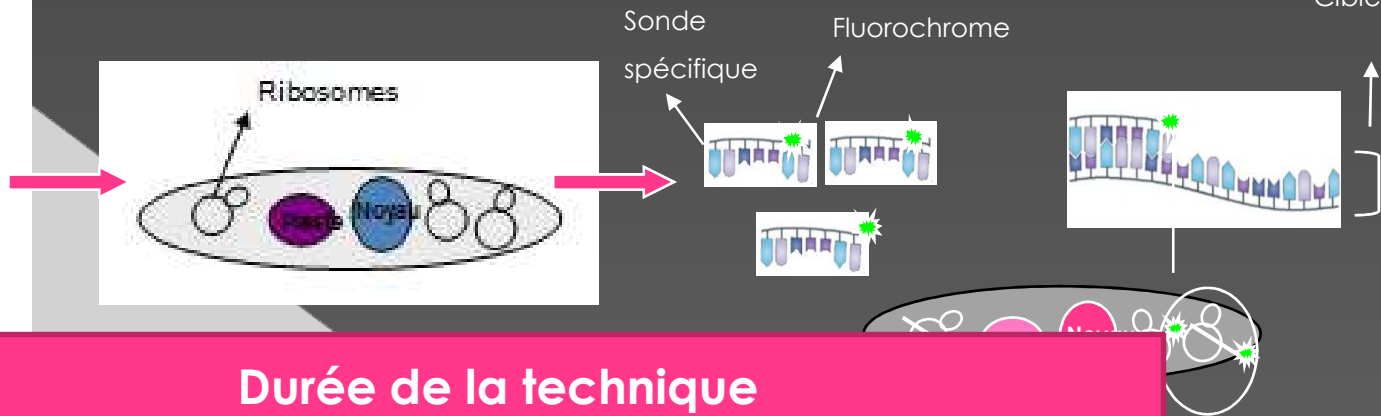
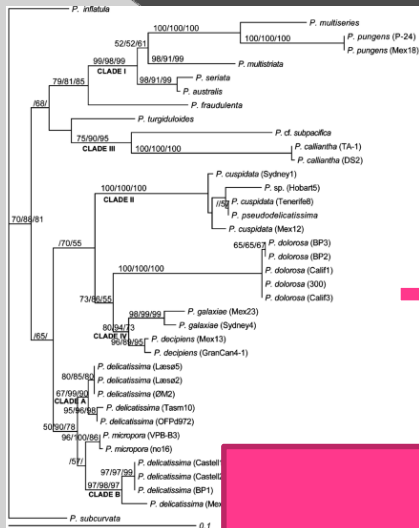
- *P. calliantha* (avant 2000) (données IFREMER)
- *P. multiseriis* (1999-2000) (Amzil et al., 2001)
- *P. australis* (à partir 2005) (Nezan et al., 2010)



Objectif

Utiliser des méthodes génétiques pour déterminer les phénologies des espèces de *Pseudo-nitzschia* et optimiser la surveillance des espèces toxiques

Fluorescent In Situ Hybridization (FISH)



1. Design
sonde sur
de la phy

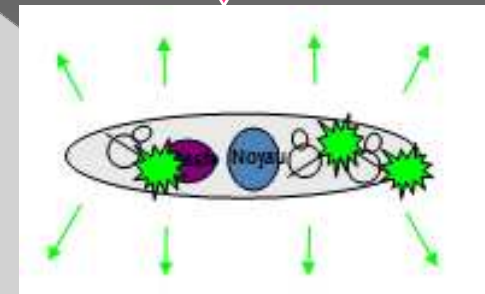
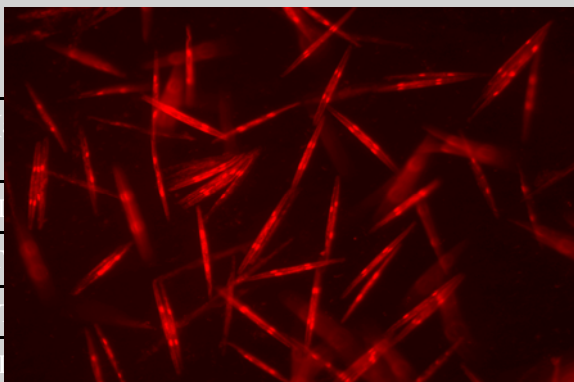
Durée de la technique

- 3h pour la préparation de l'échantillon (filtration)
- 1,5 journée d'analyse (pre- et hybridation, comptage au microscope)

que de
Je

| Sondes | Séquence (5' à 3') | |
|-----------------|--|-------------------------|
| D2C | 5' FITC -CCTTGGTCCG | |
| Paustralis53R | 5' Cy3 -CAAGACAGGTT | |
| Pmultiseriatus2 | 5' Cy3 -ATGACTCACTC | |
| Ppungens | 5' FITC -ATGACTCACTC | |
| Pfraudulenta3 | 5' FITC -CCGAAGCCAGAGTGCCACGCAAATC- FITC -3' | <i>P. fraudulenta</i> |
| Pdelicatissima | 5' Cy3 -AGAGGCAGTCAAGGCCAAAGCAACC-3' | <i>P. delicatissima</i> |

5. Détection des cellules marquées

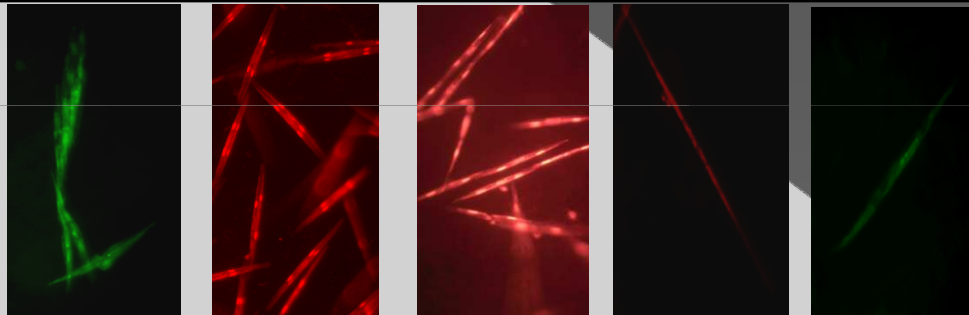


4. Emission du signal sous microscope à épifluorescence

Développement de la technique FISH

Mise au point de la technique sur des cultures

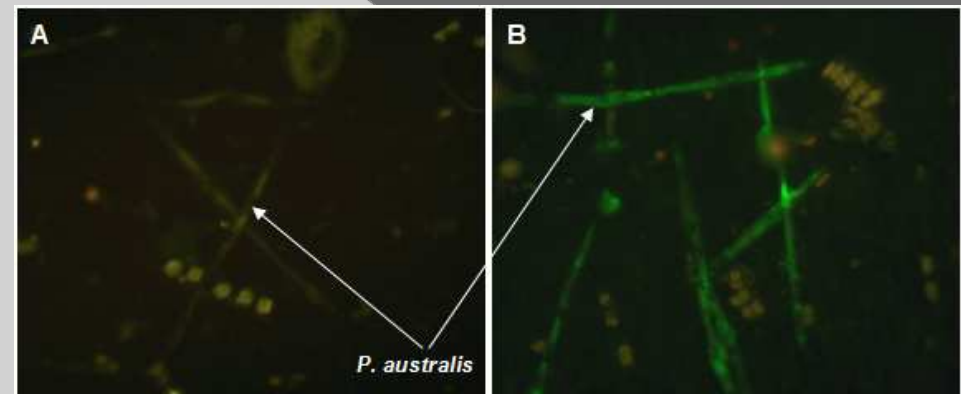
| Sondes Espèces | D2C (universelle) | Pdelicatissima | Paustralis53R | Pmultiseries2 | Ppungens | Pfraudulenta3 |
|-------------------------|----------------------|----------------|---------------|---------------|----------|---------------|
| <i>P. multiseries</i> | 2++ | - | - | ++ | - | - |
| <i>P. pungens</i> | ++ | + | + | - | ++ | - |
| <i>P. australis</i> | ++ | - | +++ | - | - | - |
| <i>P. fraudulenta</i> | ++ | - | - | - | - | - |
| <i>P. delicatissima</i> | ++ | +++ | + | - | - | - |



Mise au point de la technique sur des échantillons naturels de trait de filet



Stages de:
Emmanuel Ducasse (2011) Valerian le Roy (2012)



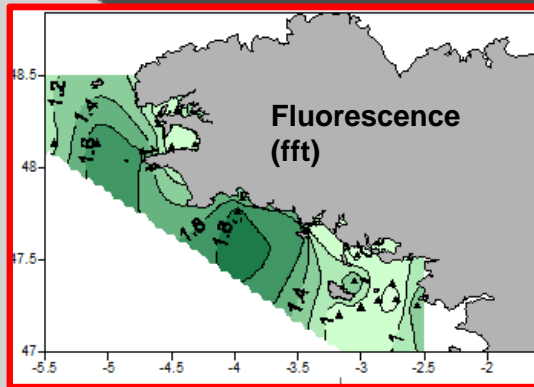
Dynamique spatiale

Campagne océanographique PSEUTEC (9-16 Juin 2011)

- Aire d'étude : Bretagne Sud et Mer d'Iroise.
- Echantillonnage : Bouteilles Niskin (comptage MO).
Traits de filets verticaux (FISH).
- Mesures des paramètres hydrologiques : Fluorescence, Température, salinité, sels nutritifs



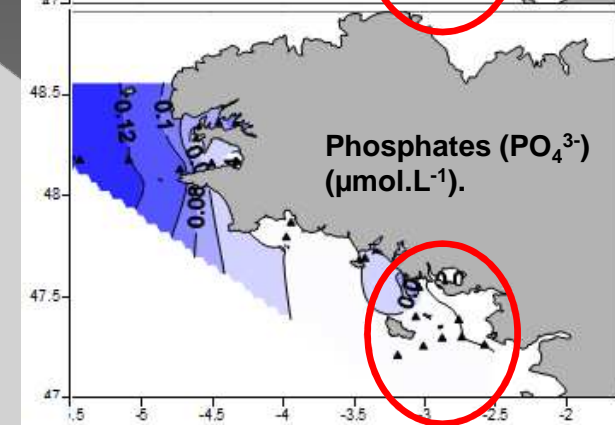
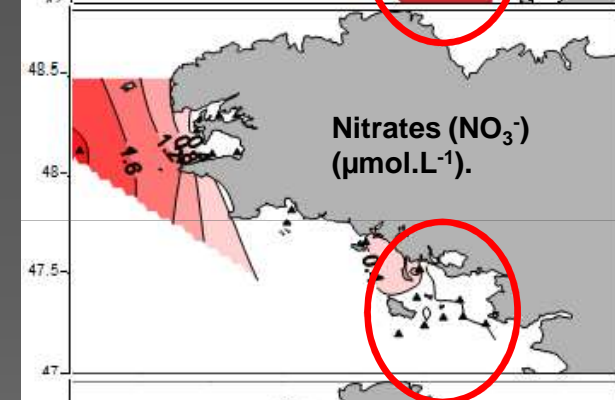
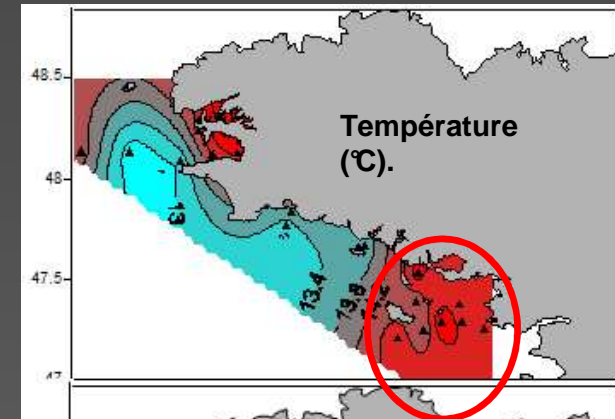
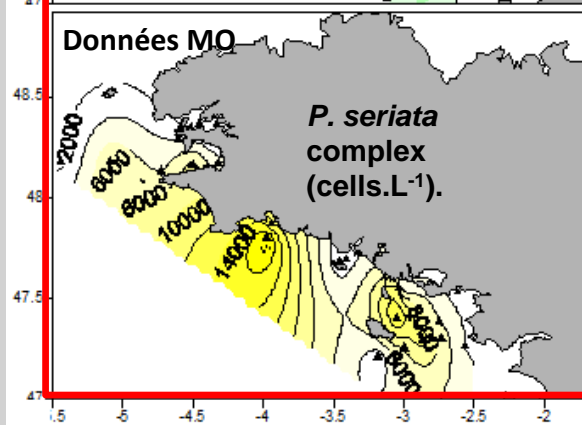
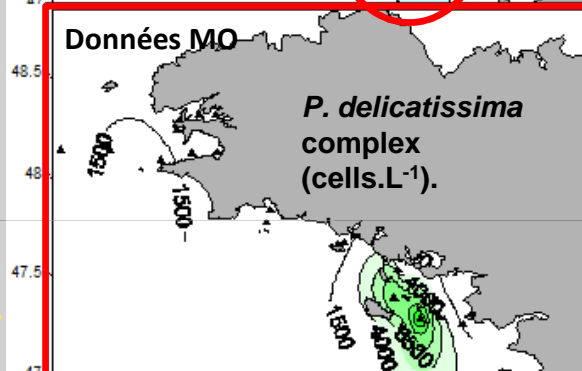
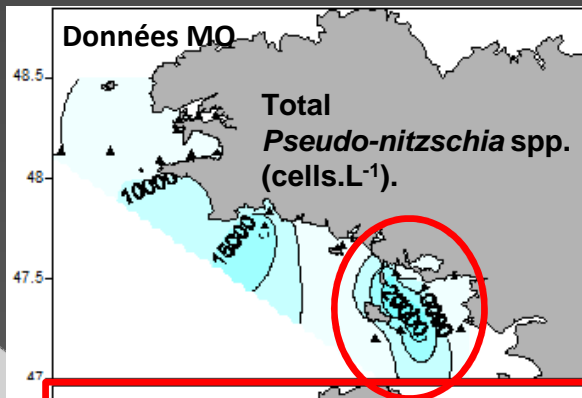
Données surface

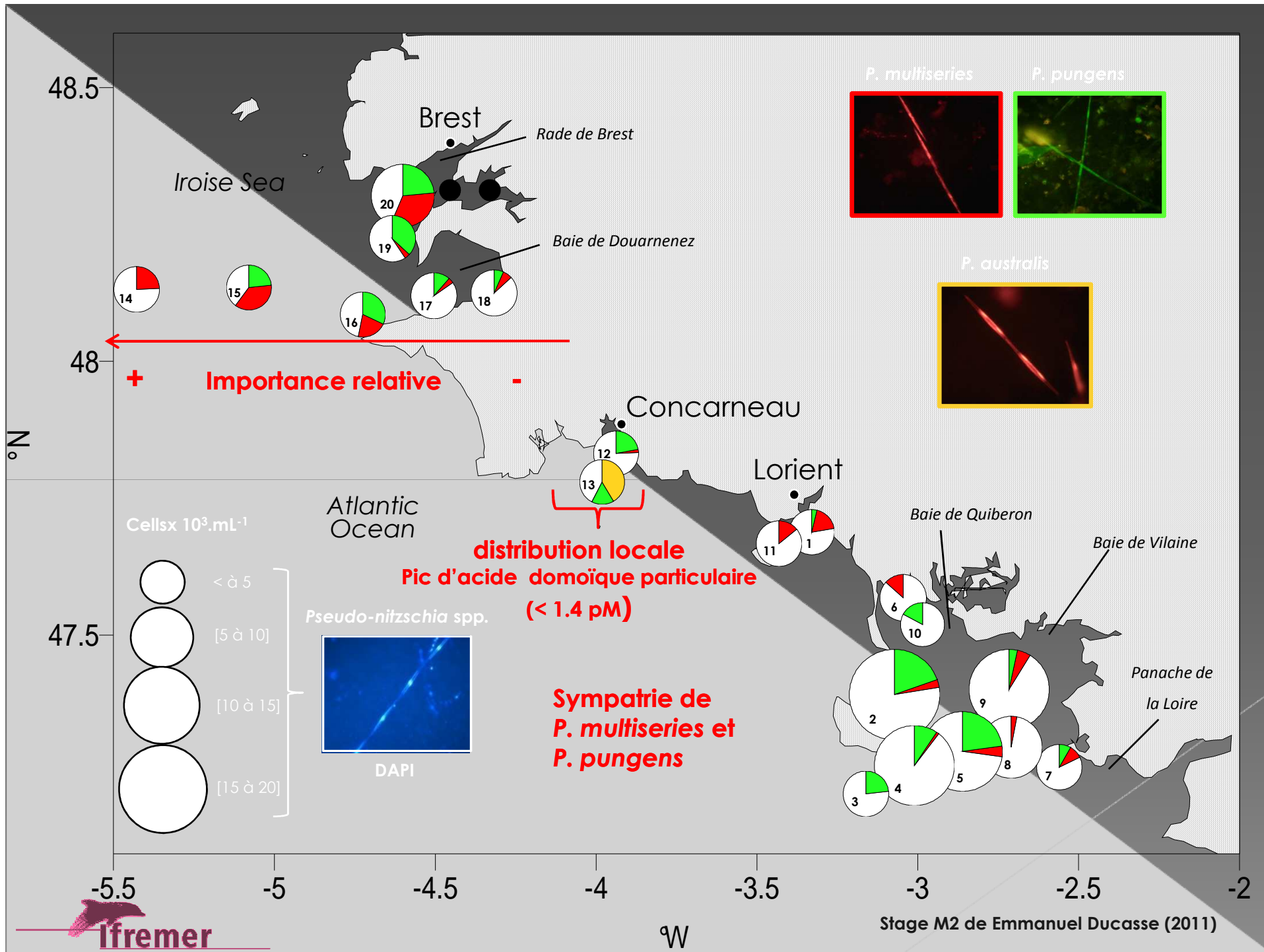


- Faibles biomasses phytoplanctoniques

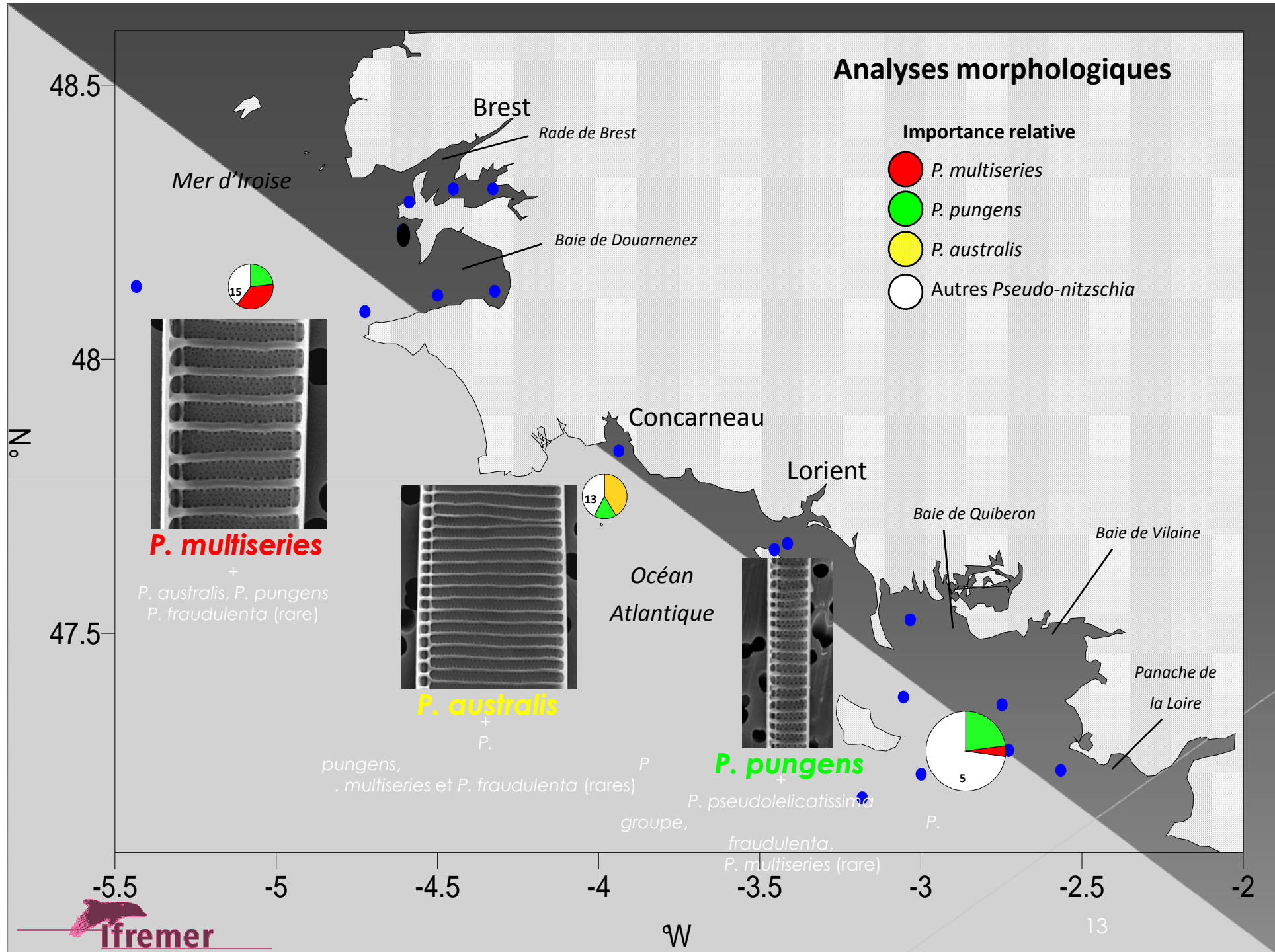
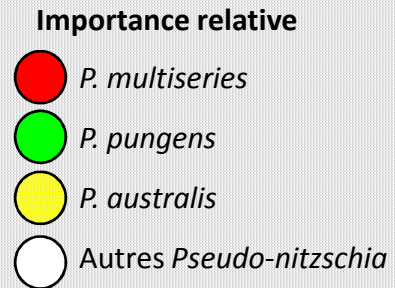
- Abondances de *Pseudo-nitzschia* < 10⁴ cells.L⁻¹

- Communautés des *Pseudo-nitzschia* différentes entre le Nord et le Sud de l'aire

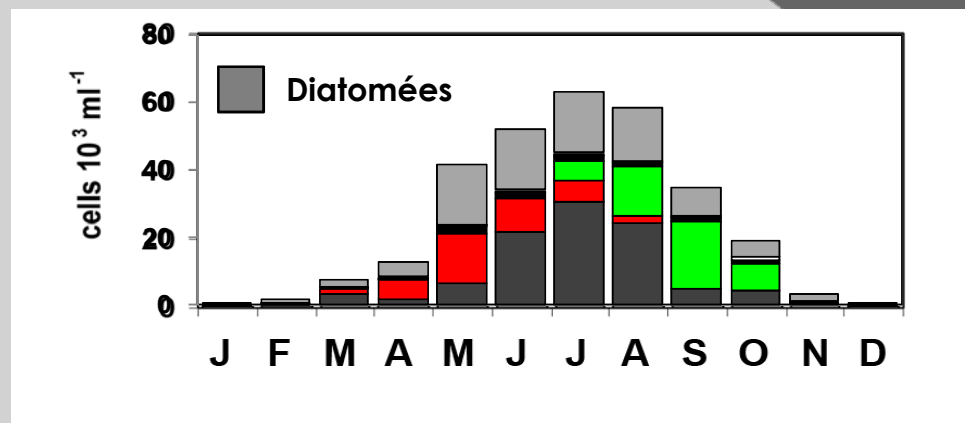
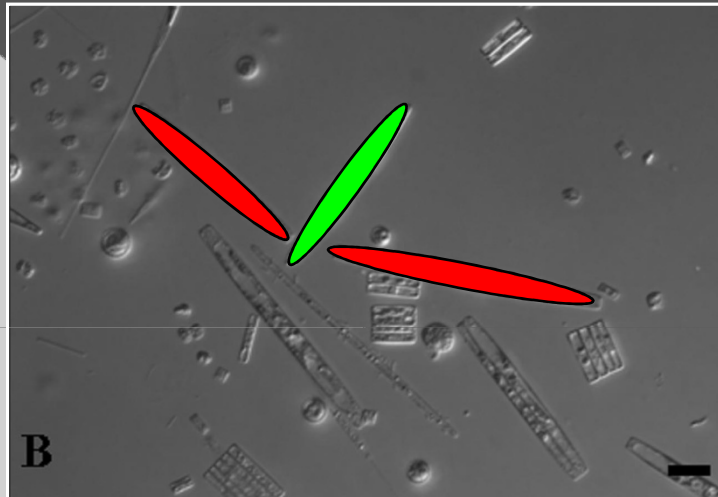




Analyses morphologiques



Est-ce que les espèces cryptiques
de *Pseudo-nitzschia* ont
une phénologie différente ?



Le projet DYNAPSE

(DYNAmique temporelle de *PSEUDO-nitzschia* en Baie de Concarneau)

- Point REPHY
- Abondances élevées de *Pseudo-nitzschia* et blooms récurrents
- Connaissance de la diversité de *Pseudo-nitzschia* spp.
- Laboratoire d'accueil proche pour le traitement des premiers échantillons et avec des moyens techniques pour réaliser l'échantillonnage

➤ Échantillonnage à haute fréquence (1 ou 2 sorties par semaine de Mars à Juillet 2012)

➤ Profils CTD

➤ Prélèvements par bouteille Niskin

Couche de surface (4-8 m)

- comptages MO, sel nutritifs, Chl, AD
- PCR, biopuces, filtres ADN environnementaux (20, 3,0.22, μm)
- cultures

➤ Traits de filet

0-20 m

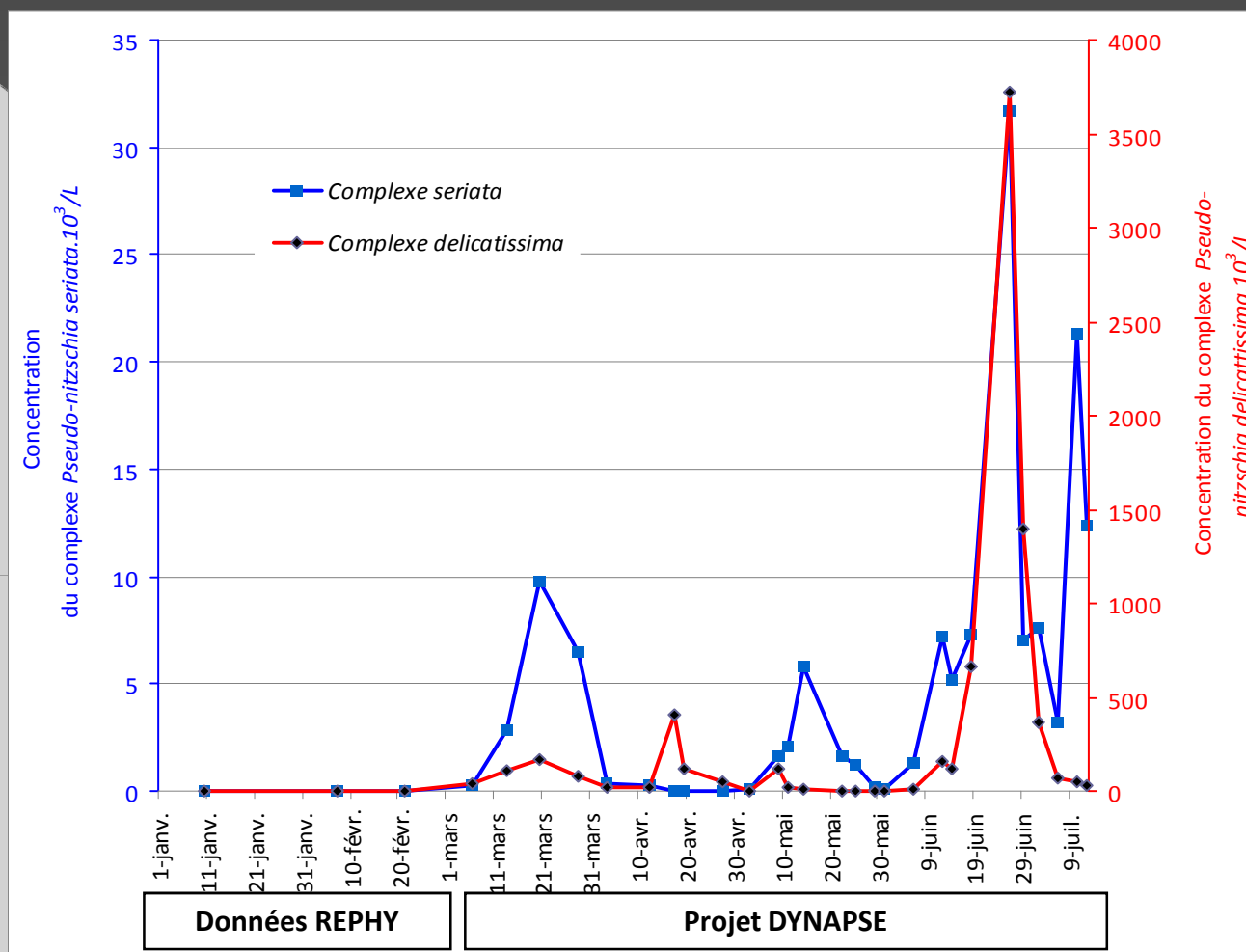
- FISH



LER
CONCARNEAU



Dynamique temporelle

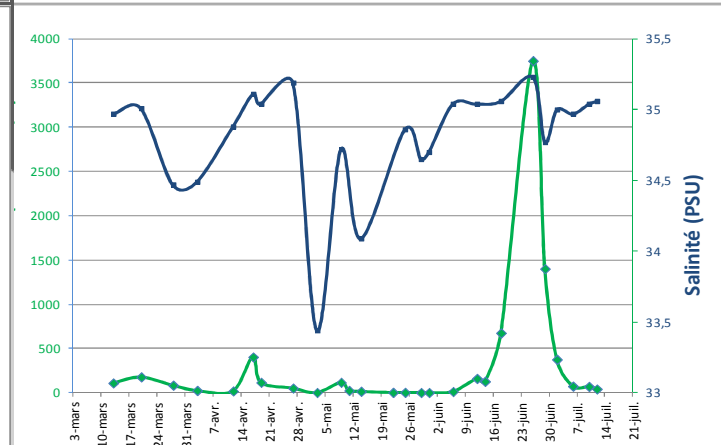
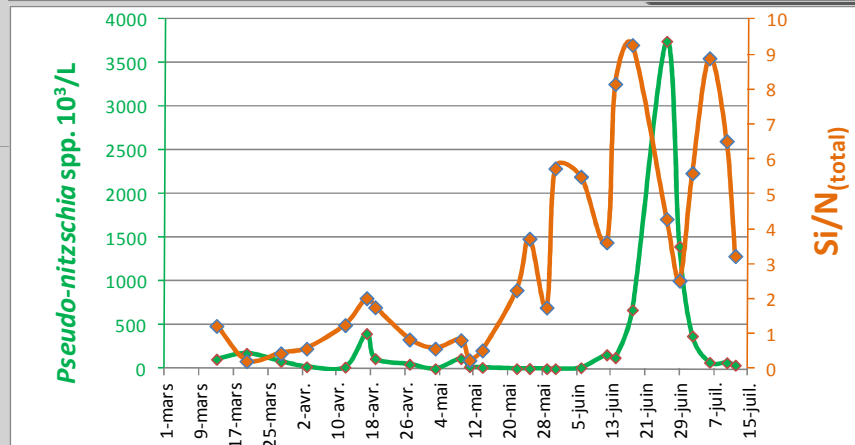
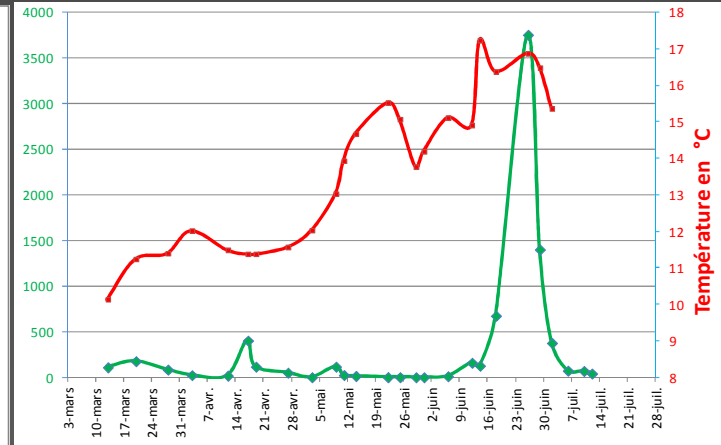
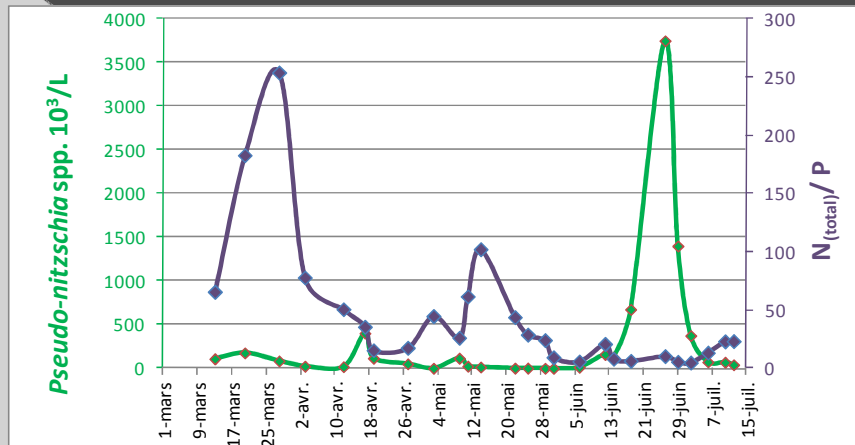


- Dominance du complexe
P. delicatissima

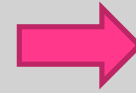
3 périodes d'efflorescence du complexe
P. seriata

- 2 périodes d'efflorescence du complexe
P. delicatissima

Efflorescences et facteurs abiotiques



Efflorescences de *Pseudo-nitzschia* en correspondance de Si/N bas



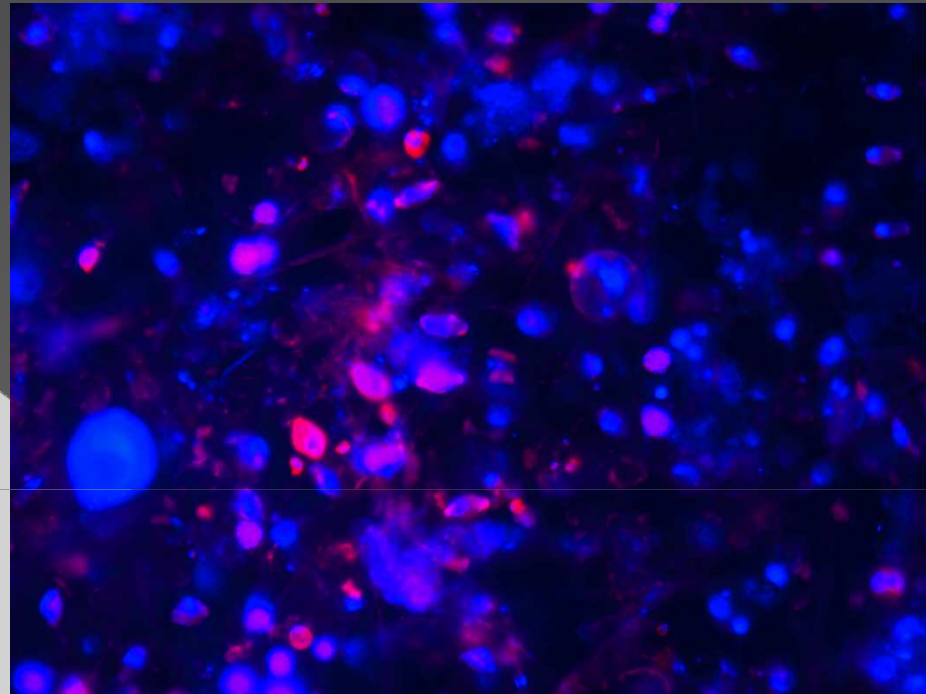
Bloom à 17°C

À comparer avec le reste de la communauté phytoplanctonique (chl, flore totale)

Identifications des espèces avec FISH

Résultats négatifs :

- Échantillons trop chargé
- Autofluorescence
- Mauvaise fixation



Application de la sonde Paustralis sur échantillons de trait de filet

Il faut adapter la technique au type d' écosystème étudié

Identification des espèces avec PCR spécifiques

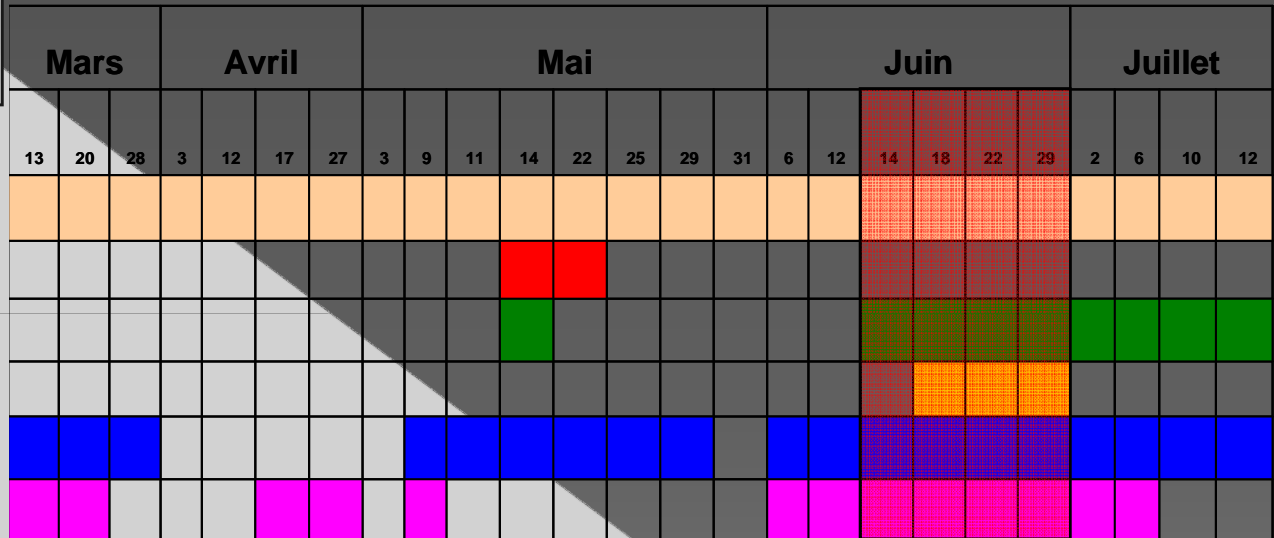


Développement des amorces spécifiques ciblant la région ITS r-DNA

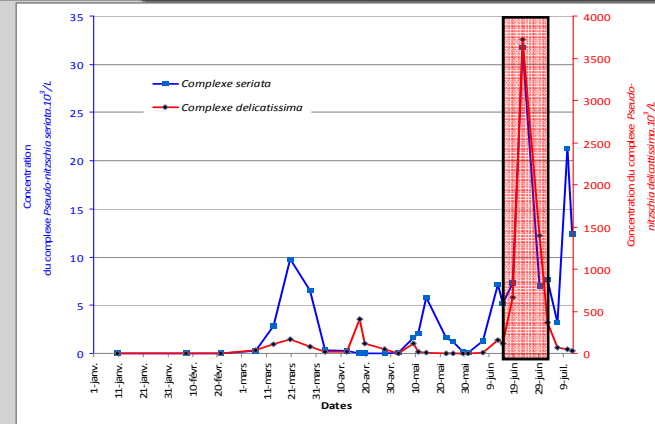
Durée de la technique
1 journée d'analyse

Échantillon n°:

3 4 5 6 8 9 10 11 12 13 T+ T-



- Aucune espèce n'a la même phénologie
- Juin majeure biodiversité
- *P. pungens* et *P. multiseriis* morphologies très proches mais phénologie différente

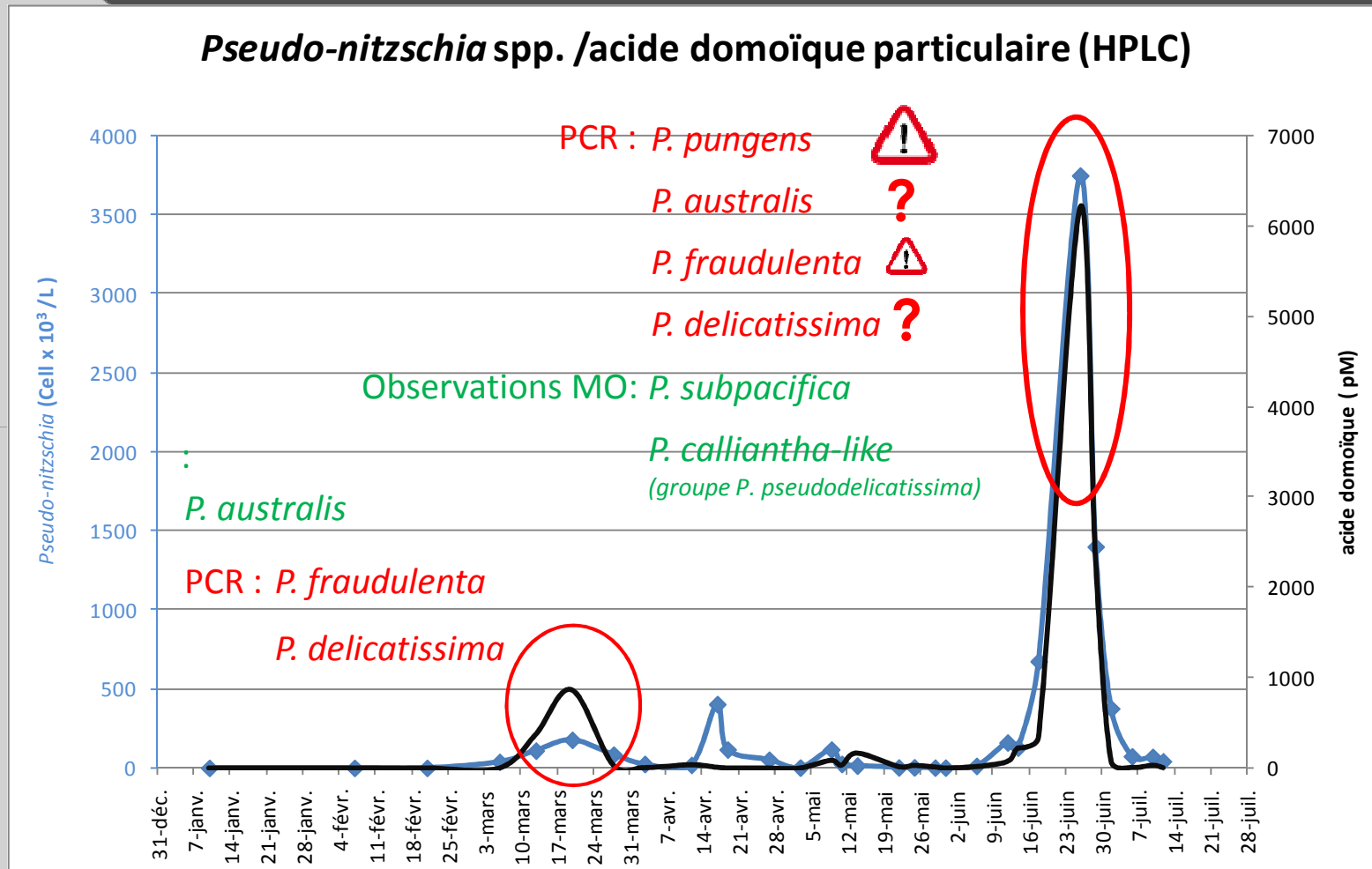


Stage Intecmer de Valerian le Roy (2012)

Efflorescences et toxicité



Culture toxique au test Elisa



↓
Palourdes roses
(max. 1.4 mgAD/kg)

↓
Palourdes roses
(max. 9.1 mgAD/kg)

↓
Saint Jacques
(max. 86.8 mgAD/kg)

Conclusions

Les espèces du genre *Pseudo-nitzschia* montrent des signatures phénologiques spécifiques, même les espèces cryptiques



Pour la recherche : jusqu'à quel niveau taxinomique (espèce ou clade) le signal de biodiversité génétique (phylogénie) correspond-t-il à un signal écologique (phénologie) ?

Pour la surveillance : Peut-on identifier le(s) espèce(s) les plus susceptibles de causer une efflorescence toxique et définir des seuils d'alerte spécifiques et plus précis avec des nouvelles méthodes de détection ?

Perspectives futures

Vérifier l'hypothèse que *P. australis* est l'origine la plus probable de la toxicité dans les coquillages ces dernières années

- Suivis temporels de la succession des espèces de *Pseudo-nitzschia* pendant une année, avec des méthodes génétiques, dans plusieurs sites ateliers choisis sur la base d'une analyse de données préliminaires
- Analyser sur les mêmes sites et pour la même période les taux de contamination et de décontamination *in situ* des coquillages (moules et Saint Jacques) marqués
- Analyser avec la même approche les données historiques (REPHY et hydro) liées aux périodes d'efflorescence et de toxicité
- Etudier *in vitro* et *in situ* les facteurs biologiques qui déterminent l'apparition et la disparition de l'espèce (prédateurs, bactéries, parasites)
- Modéliser la phénologie de l'espèce avec des paramètres physiologiques spécifiques



**Merci de votre
attention**

Variabilité de la diversité du phytoplancton en baie de Seine
de 2002 à 2011. Efflorescences phytoplanctoniques toxiques
en baie de Seine, projets TAPAS et FLAM

Mathilde Schapira et collaborateurs
Ifremer, Port en Bessin et Université de Caen Basse Normandie

**Variability in phytoplankton diversity in the Bay of Seine
over the 2002-2011 period:
Influence of weather regime shifts on harmful algae events**

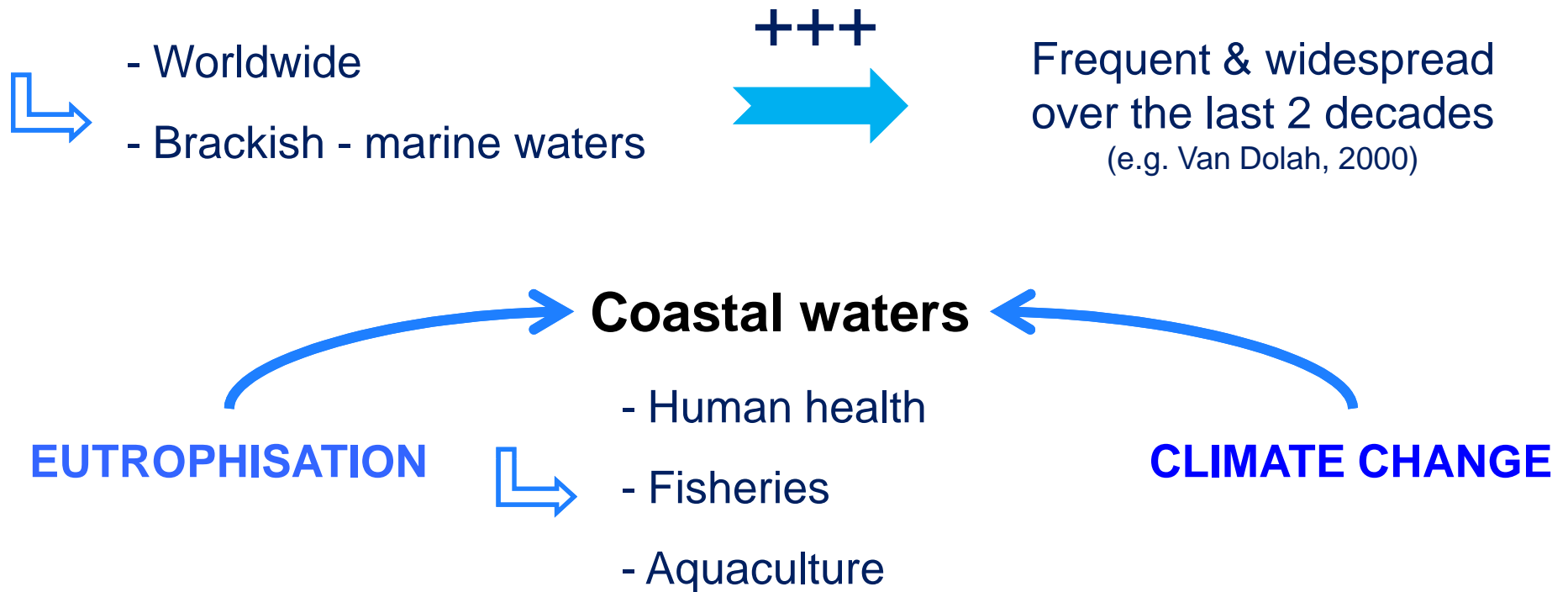
M. Schapira & R. Le Gendre
S. Françoise, P. Riou

IFREMER, Laboratoire Environnement et Ressource de Normandie,
Avenue du Général de Gaulle, BP 32, 14520 Port en Bessin,
France.



" COMANCHE " – ANR-2010-STRA-010

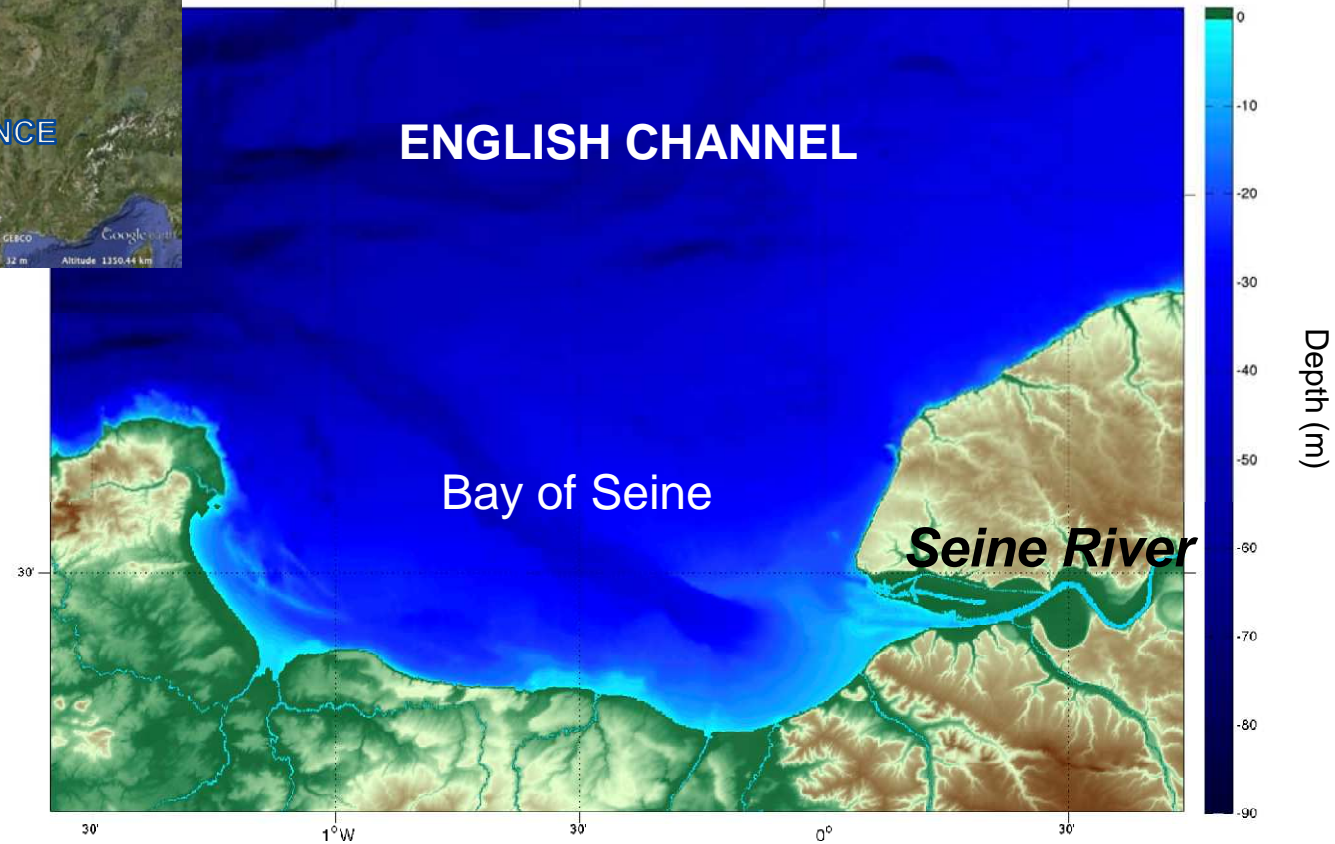
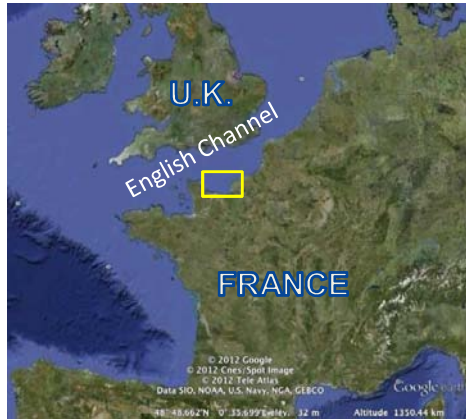
Proliferation of toxic phytoplankton



Long term management



BAY OF SEINE (Eastern English Channel)



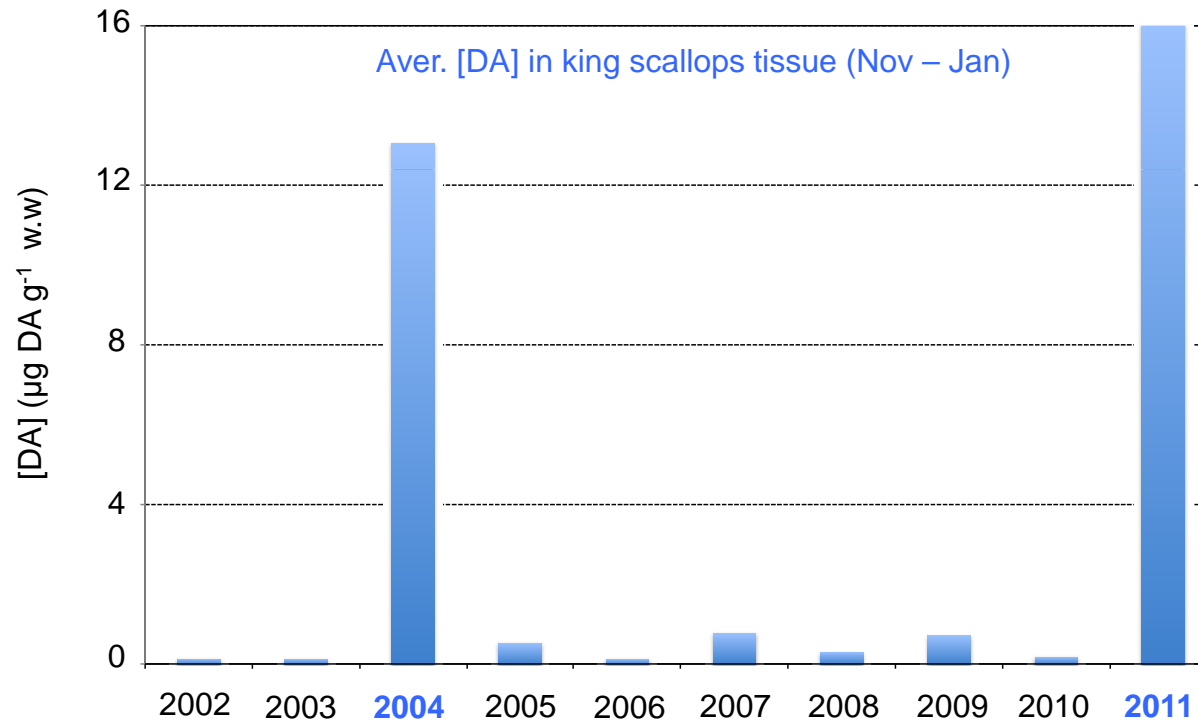
- ❖ Megatidal regime
- ❖ Large freshwater inputs
 - Seine river ($418 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$)
 - Many secondary watersheds

BAY OF SEINE (Eastern English Channel)



- ❖ King scallops (*Pecten maximus*) -1st species in landing (tons & value)
- ❖ 2 major toxic events 2004 & 2011: ASP (Amnesic Shellfish Poisoning)

[DA] > EU-regulatory limit (i.e. 20 $\mu\text{g DA g}^{-1}$ w.w.)



BAY OF SEINE (Eastern English Channel)



- ❖ King scallops (*Pecten maximus*) -1st species in landing (tons & value)
- ❖ 2 major toxic events 2004 & 2011: ASP (Amnesic Shellfish Poisoning)

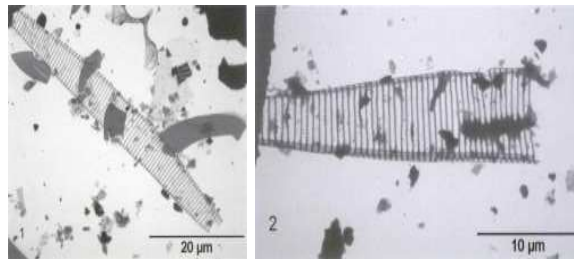
[DA] > EU-regulatory limit (i.e. 20 µg DA g⁻¹ w.w.)

↳ Proscription of harvesting

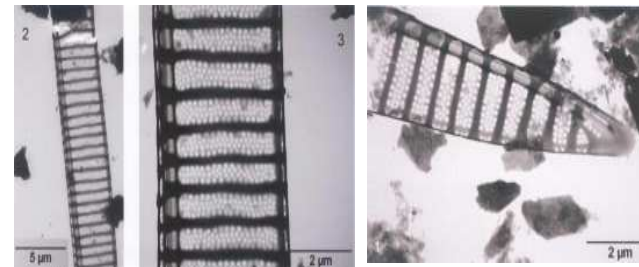
➔ DIATOM: *Pseudo-nitzschia* spp.



2 *Pseudo-nitzschia* species = potential source of [DA]
in 2004 & 2011

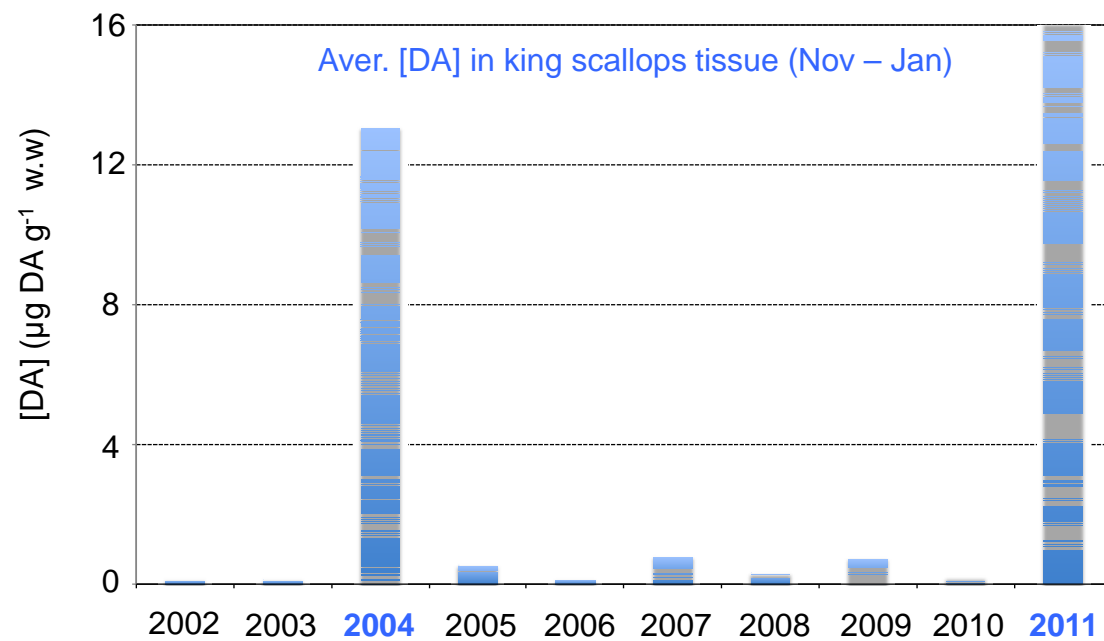


Pseudo-nitzschia australis



Pseudo-nitzschia multiseriata

Environmental factors involved in the 2004 and 2011 toxic events ?



PHYTOPLANKTON & ENVIRONMENTAL PARAMETERS

❖ Data: French monitoring networks REPHY & RHLN

- Site: “Cabourg” (1 nm offshore)
- Period: 2002-2011
- Sampling frequency:
 - bimonthly (April - Sept.)
 - monthly (Oct. - March)



❖ Parameters: Sub-surface (1m)

- T°C - Salinity
- [Nutrients] : silicate, phosphate, nitrate + nitrite, ammonium
- [Chl a]
- Phytoplankton identification

Pseudo-nitzschia spp.

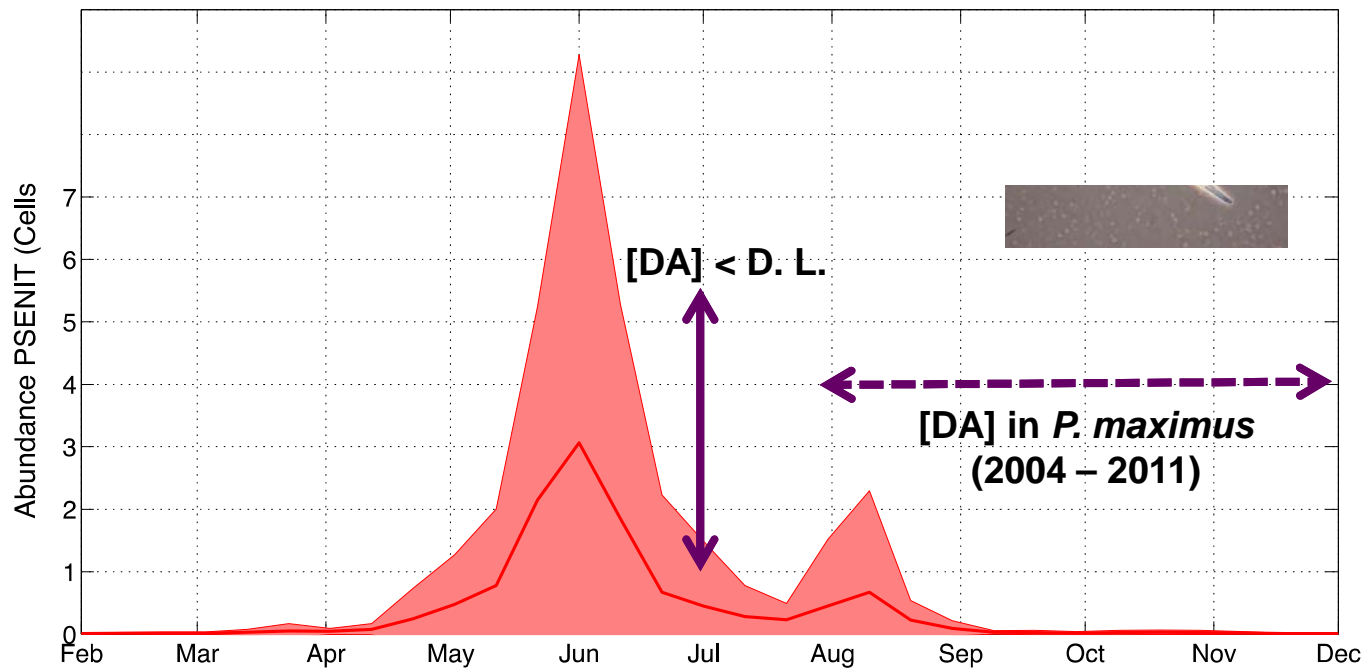
Vs

Toxicity ?

PHYTOPLANKTON

- ❖ **Productive period:** from March to September
- ❖ **Diatoms:** 1st dominant group throughout the productive period
- ❖ **Dinoflagellates:** 2nd dominant group - in summer

2 blooms of *Pseudo-nitzschia* spp.

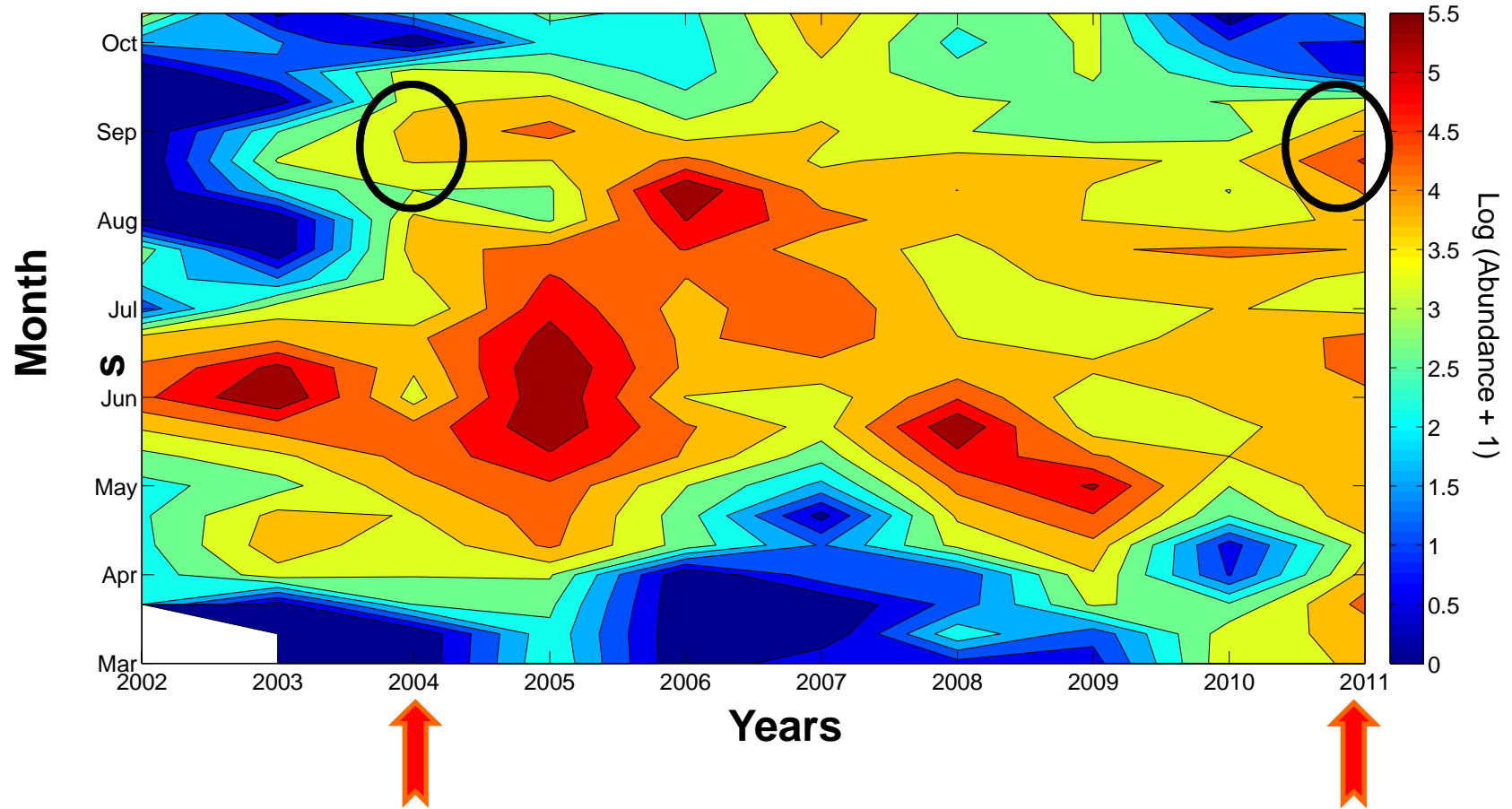


↳ **Summer bloom = toxic ?**

PSEUDO-NITZSCHIA



Pseudo-nitzschia spp.

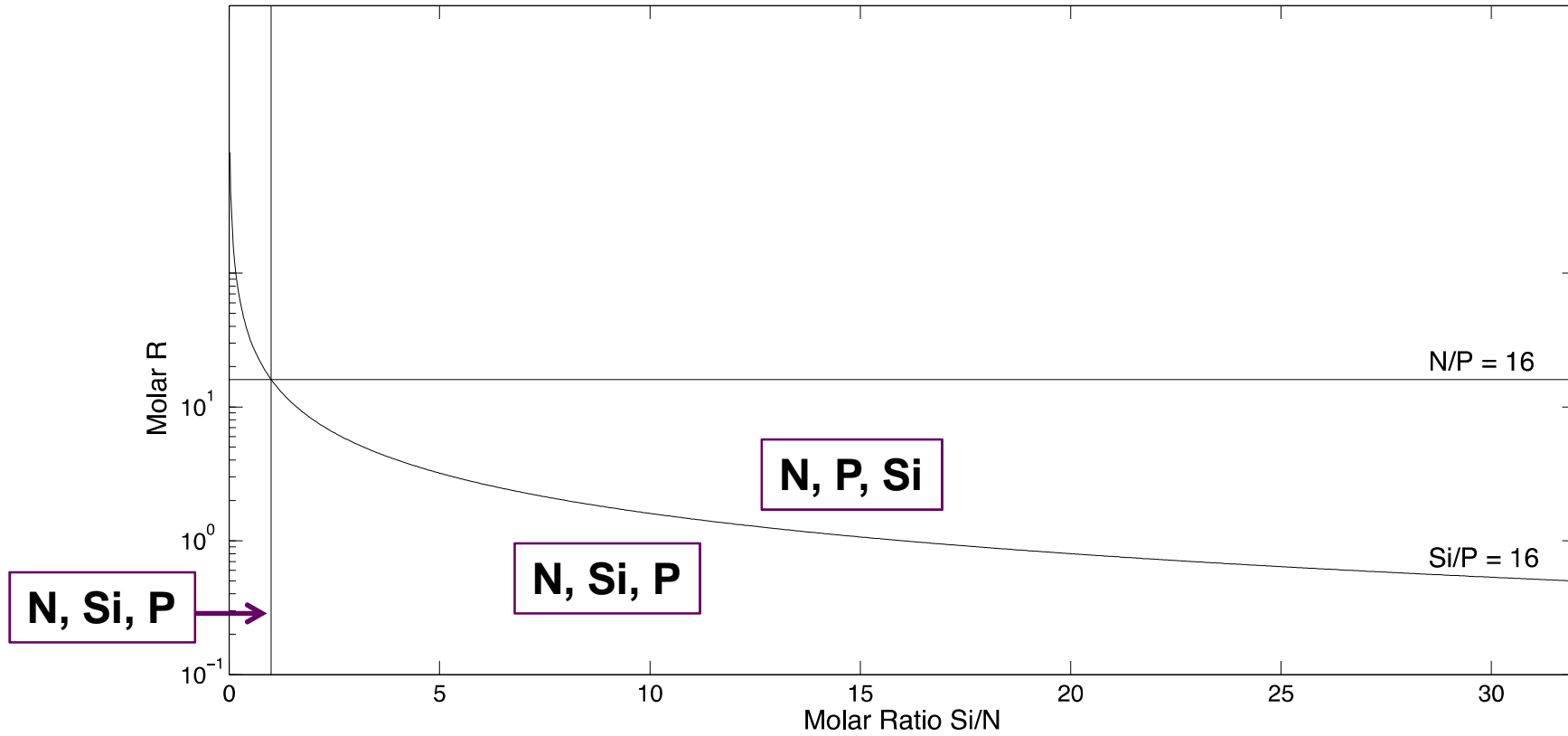


No significant relationship ($p > 0.05$)
between *Pseudo-nitzschia* spp abundances and [DA]

*Role of hydrological parameters
on domoic acid production ?*

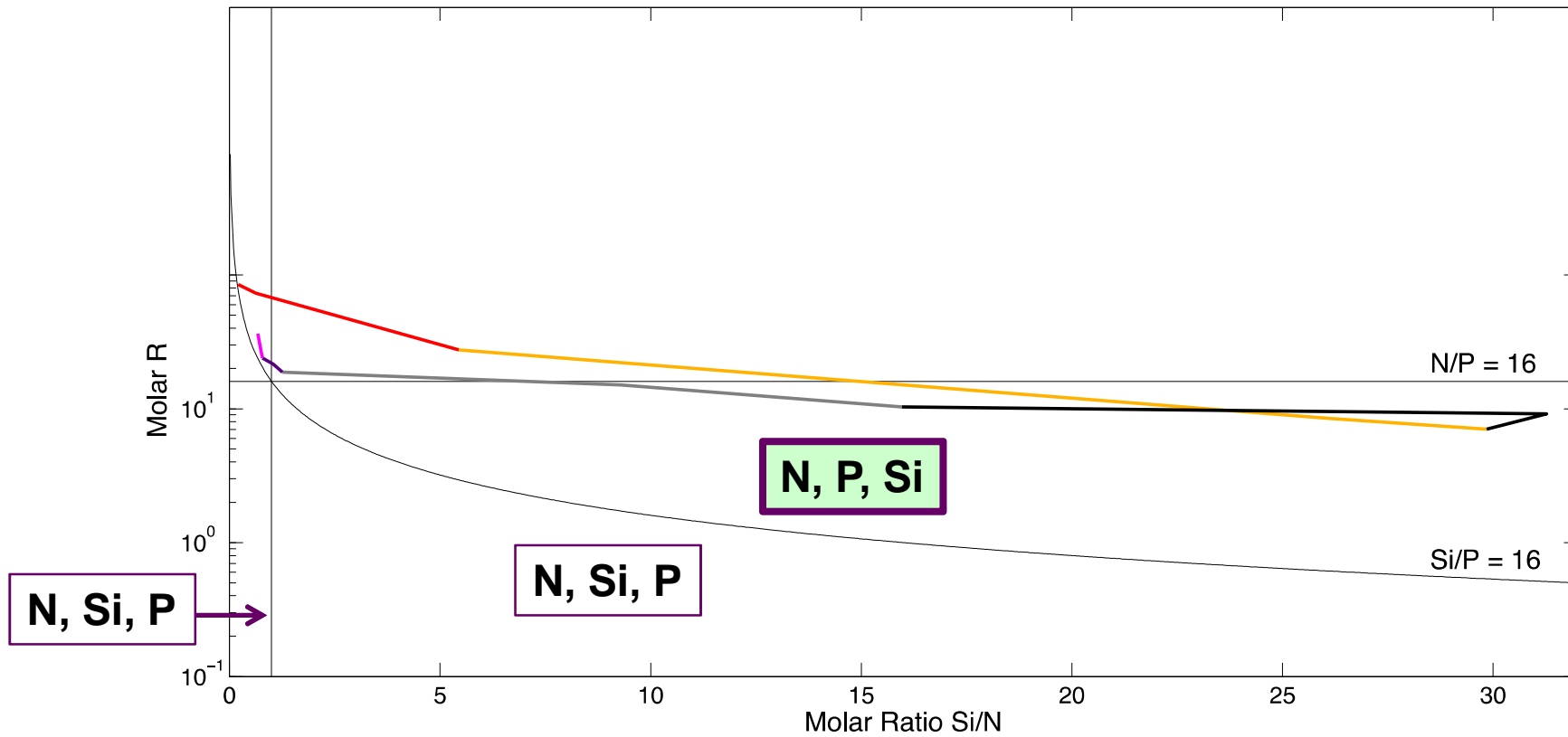
NUTRIENTS

Redfield ratios: Si/N/P = 16/16/1



NUTRIENTS

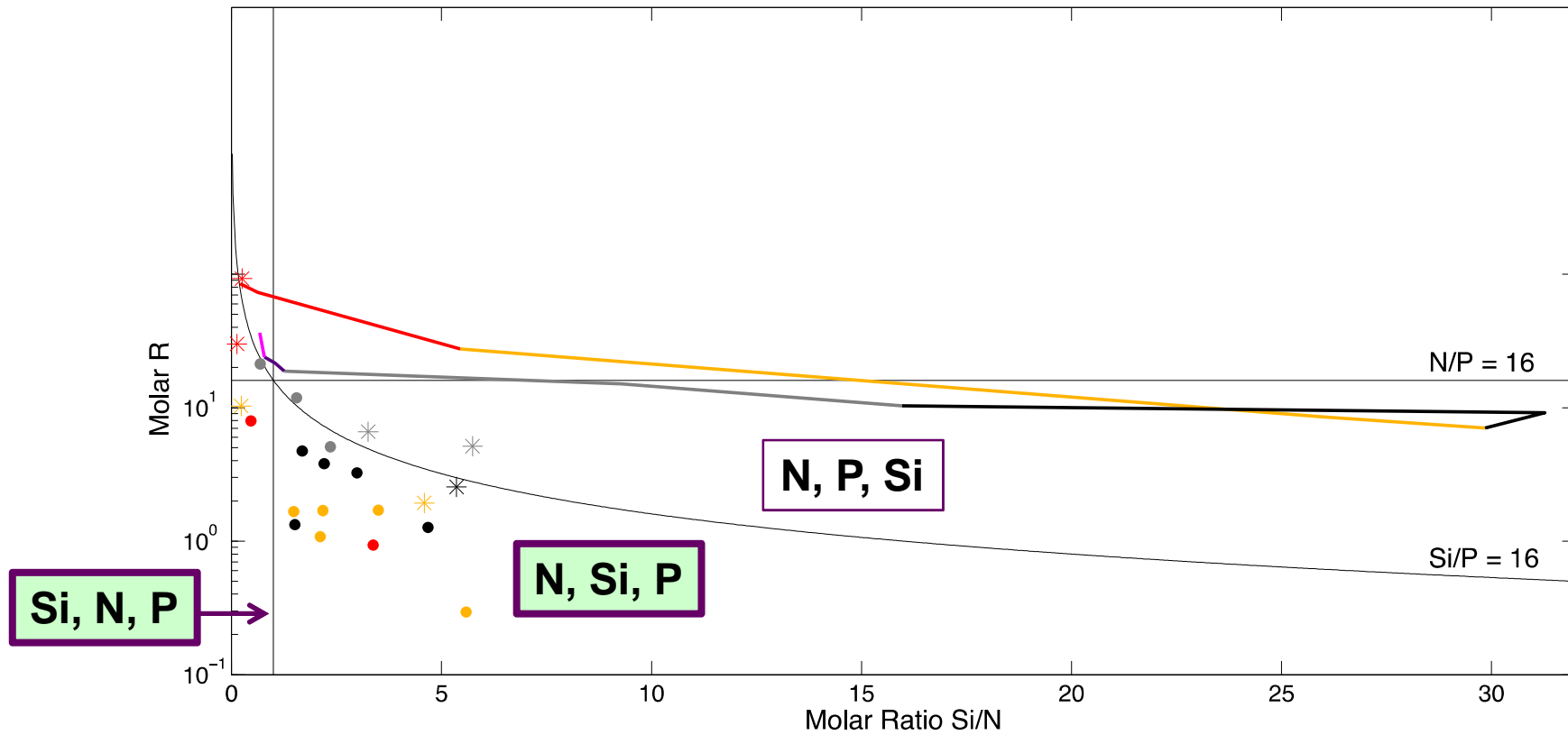
Redfield ratios: Si/N/P = 16/16/1



Summer : N & P = potential limiting factors

NUTRIENTS

Redfield ratios: Si/N/P = 16/16/1



Summer 2004 & 2011: N & Si = potential limiting factors

NUTRIENTS



Si limitation



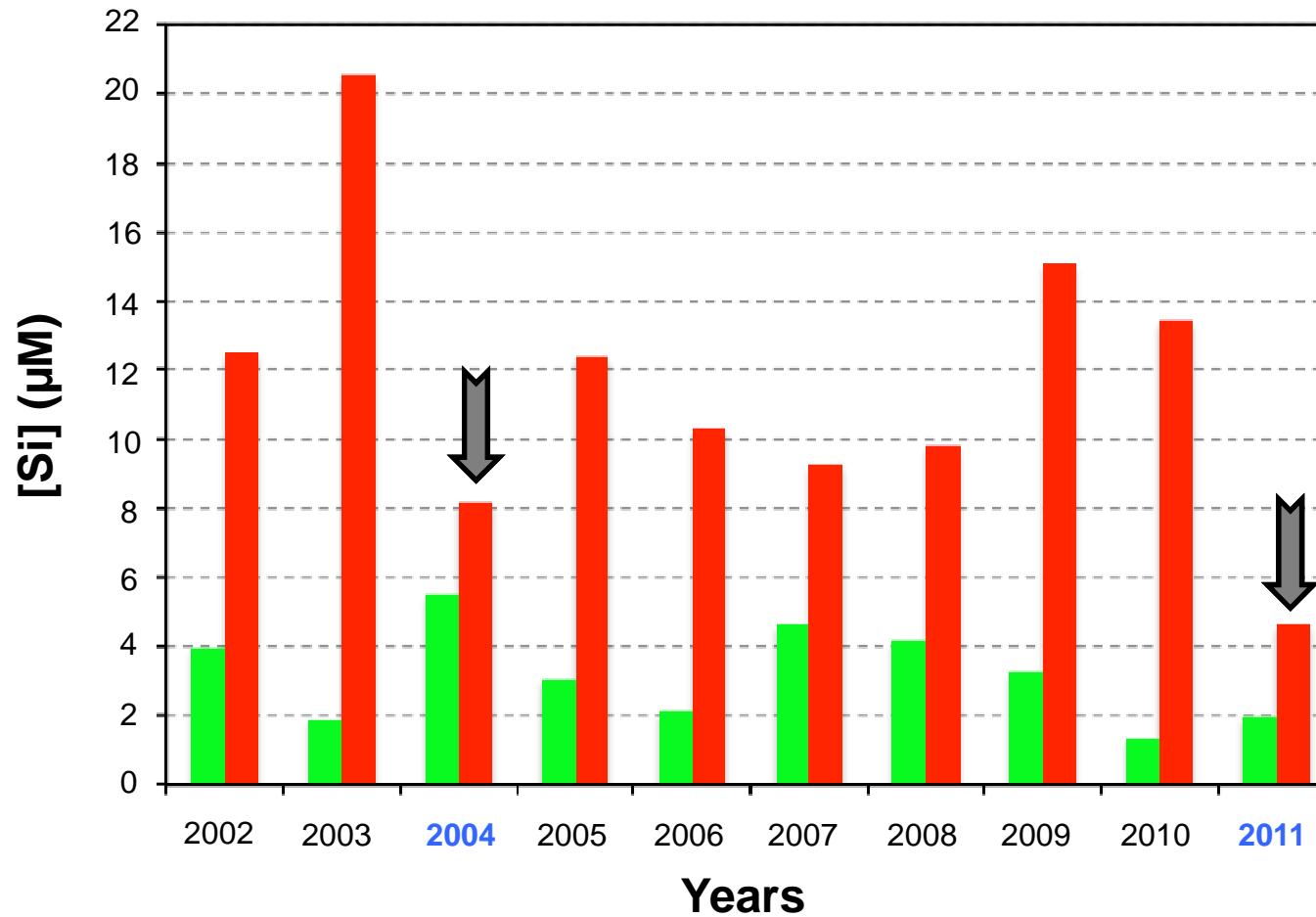
Metabolic processes



DOMOIC ACID PRODUCTION

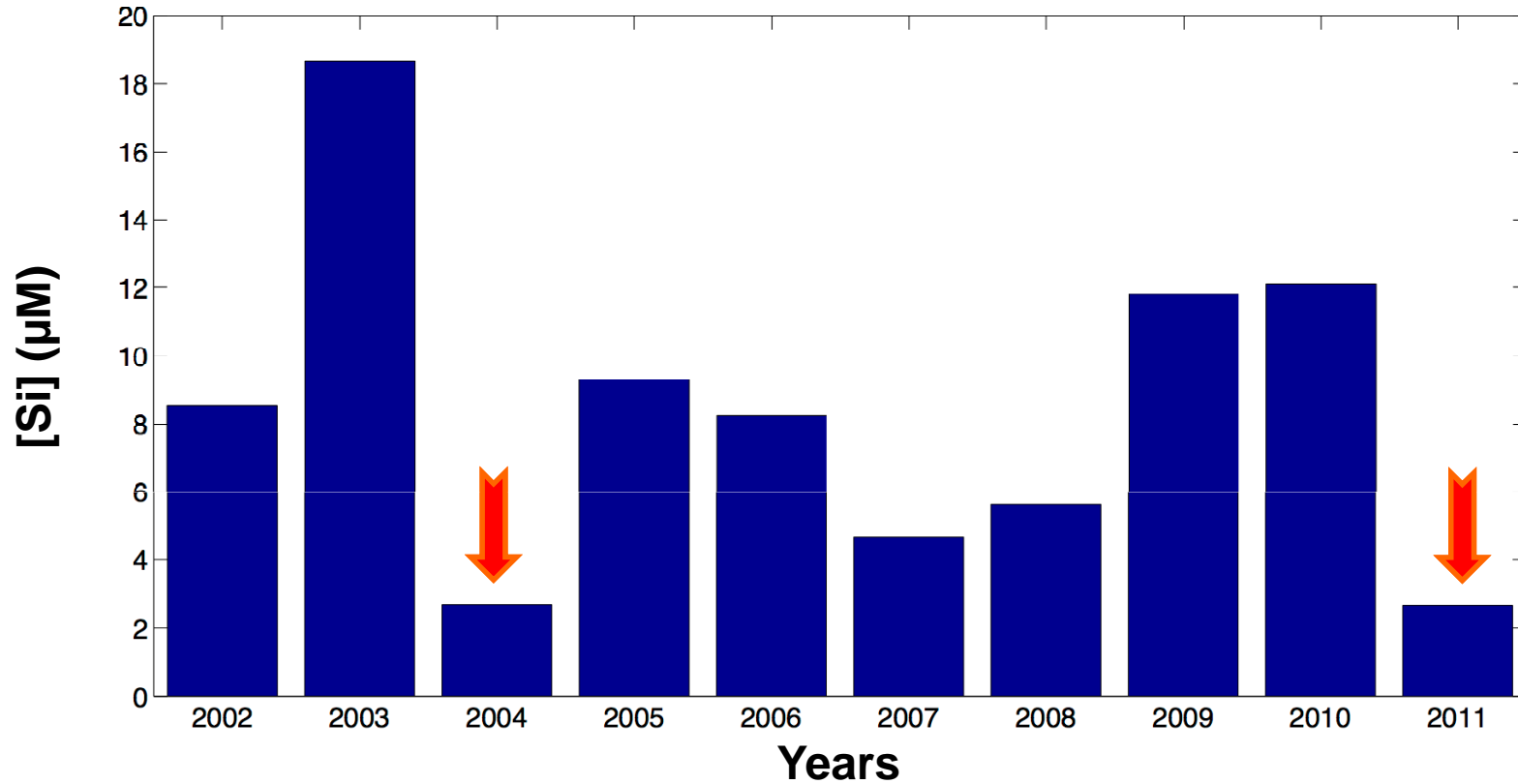
[Si]

Mean seasonal [Si]: **spring** (April-May-June) & **summer** (July-Aug-Sept)



↳ Summer 2004 & 2011: low [Si] (i.e. < 8 µM)

Summer – Spring [Si]



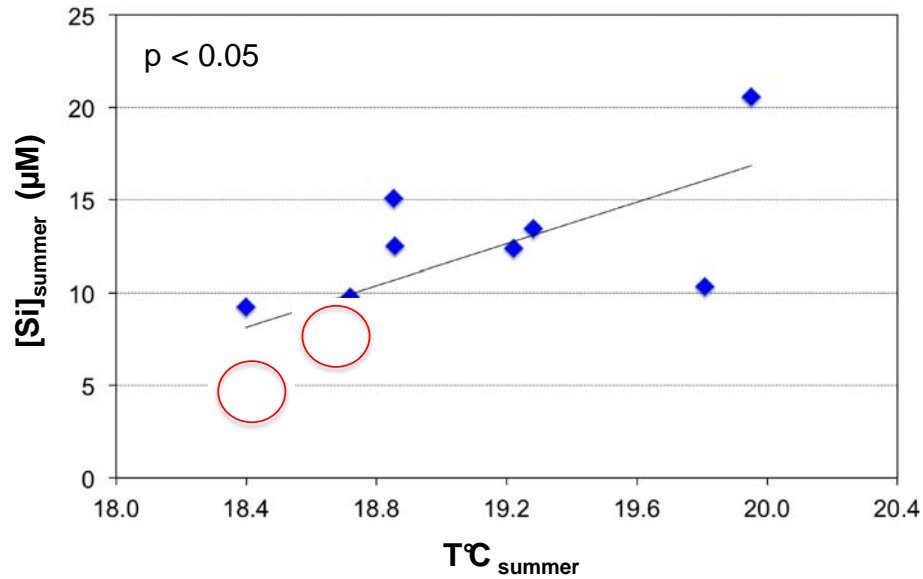
↳ 2004 & 2011: weak increase in [Si] from spring to summer

➔ 2004 & 2011: Weak Si regeneration ?

Factors controlling Si regeneration ?

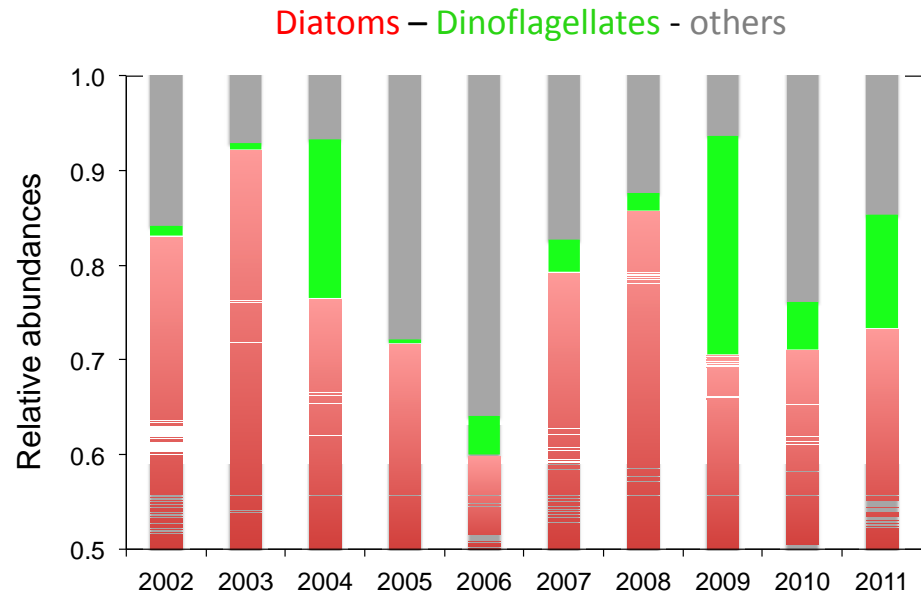
Si REGENERATION

❖ Temperature ?



↳ 2004 & 2011: low $T^{\circ}\text{C}$ in summer

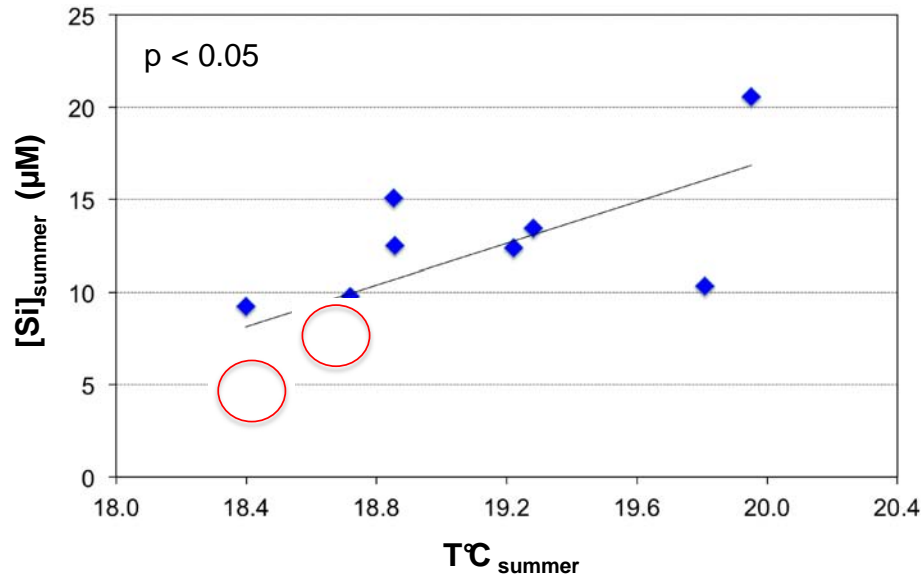
❖ B-Si in spring ?



↳ 2004 & 2011: Dinoflagellates abundant in spring

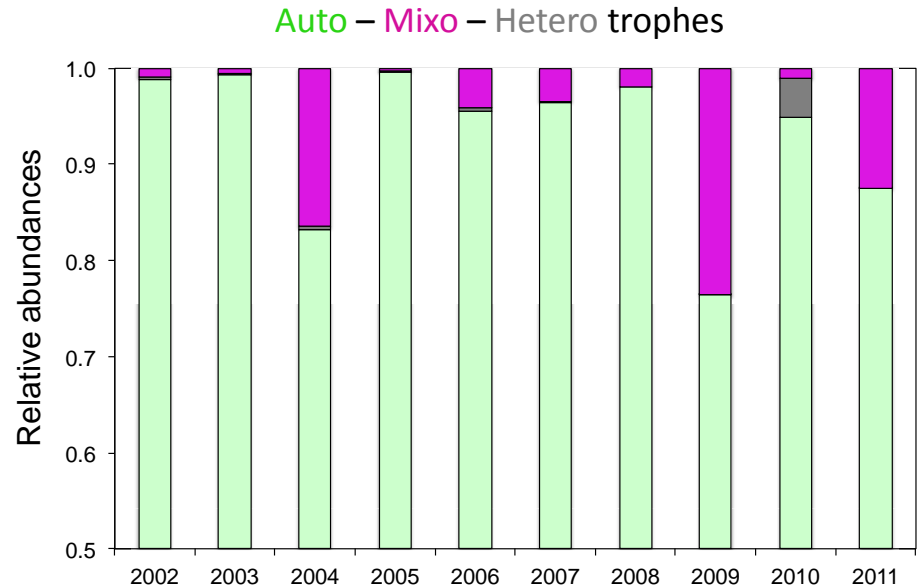
Si REGENERATION

❖ Temperature ?



↳ **2004 & 2011: low $T^{\circ}\text{C}$ in summer**

❖ Downward flux of B-Si?



↳ **2004 & 2011: Dinoflagellates abundant in spring**

↳ **2004 & 2011: complex food web structure in spring - different grazing pressure on diatoms ?**

➔ **Further work is needed to confirm these hypothesis**

CONCLUSIONS _ PERSPECTIVES

2004 – 2011 – TOXIC EVENTS

Dynamics of *Pseudo-nitzschia*

- 2 blooms of *Pseudo-nitzschia* spp.
- Summer bloom = toxic ?



- Identification & dynamics of the TOXIC species (*P. australis* & *P. multiseriata*)

- [DA] in the water column

New project = « TAPAS » 2012/2013

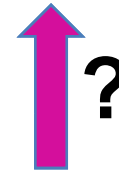
Nutrients availability & molar ratios : Si/N

- Si & N limitation
- low [Si] in summer

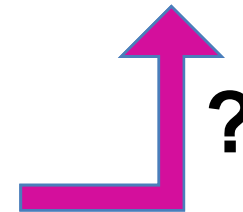


Si regeneration processes

- Temperature ?
- Spring bloom of dinoflagellates ?
- Composition of the diatoms community in spring?



Weather regimes – Freshwater inputs



Efflorescences phytoplanctoniques toxiques en Baie de Seine

TAPAS – FLAM

Ifremer - LERN

M. Schapira, R. Le Gendre, S. Françoise, E. Rabiller,
O. Pierre-Duplessix, F. Maheux, B. Simon, L. Fiant, P. Riou

&

Université de Caen Basse-Normandie

P. Claquin, J. Fauchot, M. Thorel, V. Raimbault, B. Leroy

IFREMER-RDT – (C. Dreanno)

&

IFREMER- Dyneco – (R. Siano)

TAPAS

Toxic Algal blooms Phenology in the Bay of Seine

Financements: Agence de l'eau Seine Normandie (AESN) & Fonds Européens de la Pêche (FEP)

AXE 1 : Dynamique spatiale et temporelle de *Pseudo-nitzschia* spp. en Baie de Seine

Données REPHY – Période 2002-2011

AXE 2 : Cycle de vie de *Pseudo-nitzschia* spp.: implications sur la phénologie des blooms et la production d'acide domoïque en Baie de Seine

***In vitro*: cultures de *Pseudo-nitzschia* (Thèse de Maxine Thorel, UCBN)**

***In situ*: Baie de Seine – 2 sites d'étude**

OBJECTIFS

1) Phénologie des blooms de PZN

croissance – succession – cycle de vie

2) Relation avec production de DA

3) Rôle des panaches de la Seine et de l'Orne

4) Identifier les facteurs contrôlant

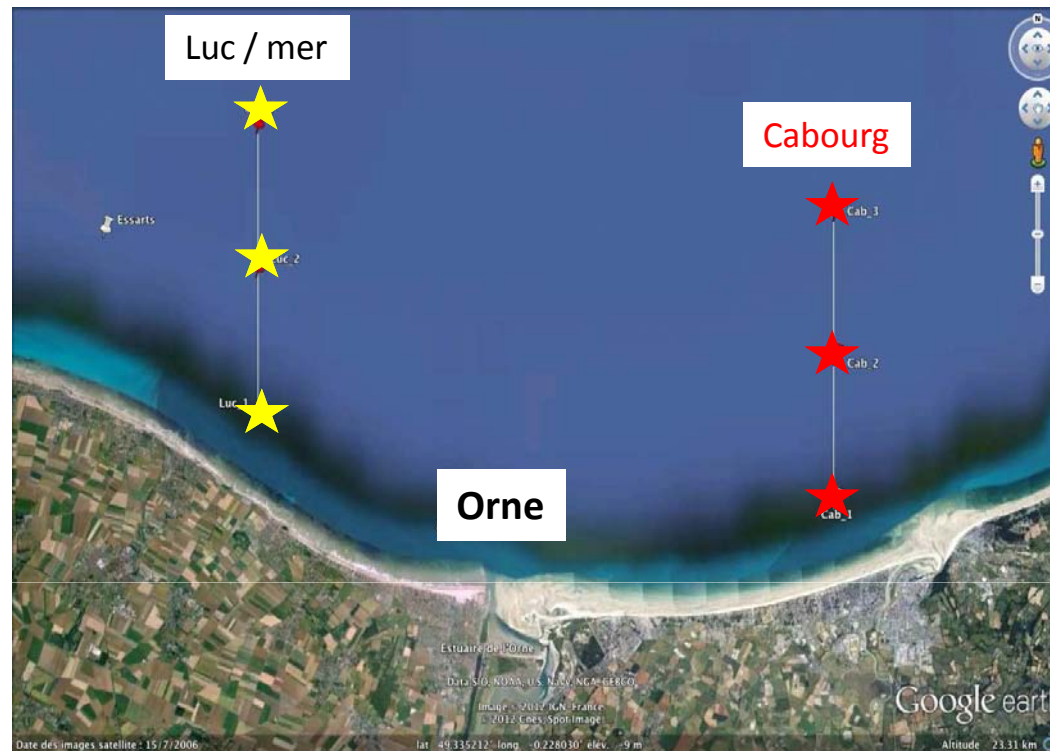


- Identification des différentes espèces de PZN
- Suivi de la concentration [DA]
- Suivi des paramètres physico-chimiques et biologiques

SUIVI *in situ* – haute fréquence



SUIVI *in situ* – haute fréquence



- **HEBDOMADAIRE:** Mai à Septembre
- **BI-MENSUEL:** Octobre à Décembre
(Janvier – Mai 2013: **FLAM**)

SUIVI *in situ* – haute fréquence

Paramètres Physico-chimiques (profils verticaux)

- CTD: T° C, S, [O₂], PAR, *Fluo in situ*
- LISST: granulométrie laser

Dissous et particulaire (sub-surface, Niskin)

- Sels nutritifs : Nitrite, nitrate, ammonium, silicate, phosphate et **urée**
- Matière particulaire: MES, MOP, MIP et TEP
- **Acide domoïque particulaire**

Phytoplancton (sub-surface, Niskin)

- [Chl *a*]
- Production primaire (PAM & A*)
- Composition floristique
- Isolement (cultures)
- Communautés bactériennes : (i) hétérotrophes et (ii) autotrophes (FCM)

Pseudo-nitzschia (sub-surface, filet)

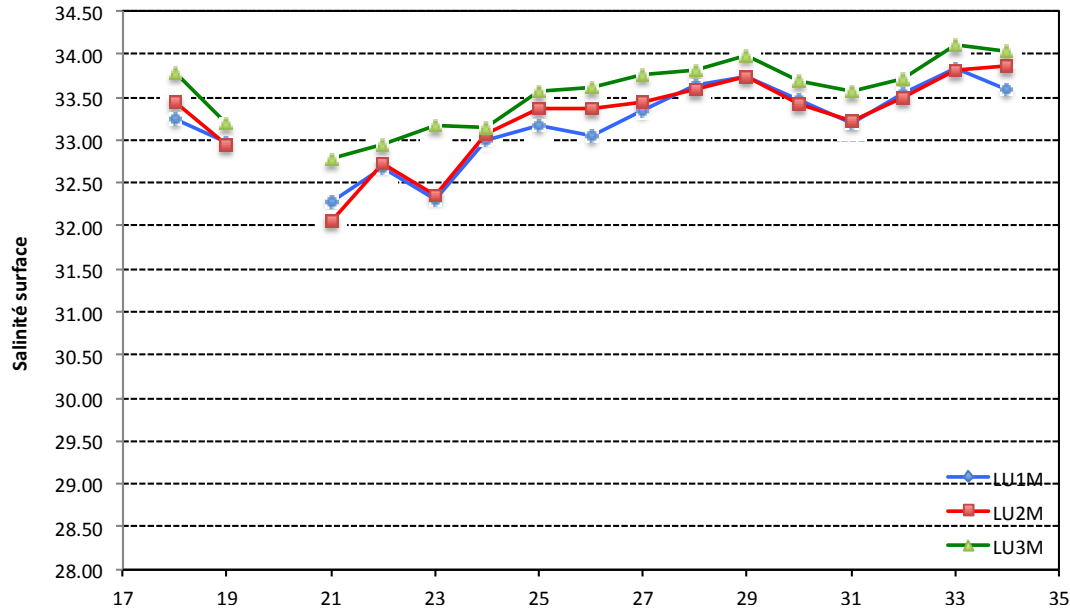
- FISH & BIOPUCES: outils moléculaires d'identification des espèces
- Taille des cellules, colonies (Nb, taille)

(Fer et Cuivre - DCE chimie)

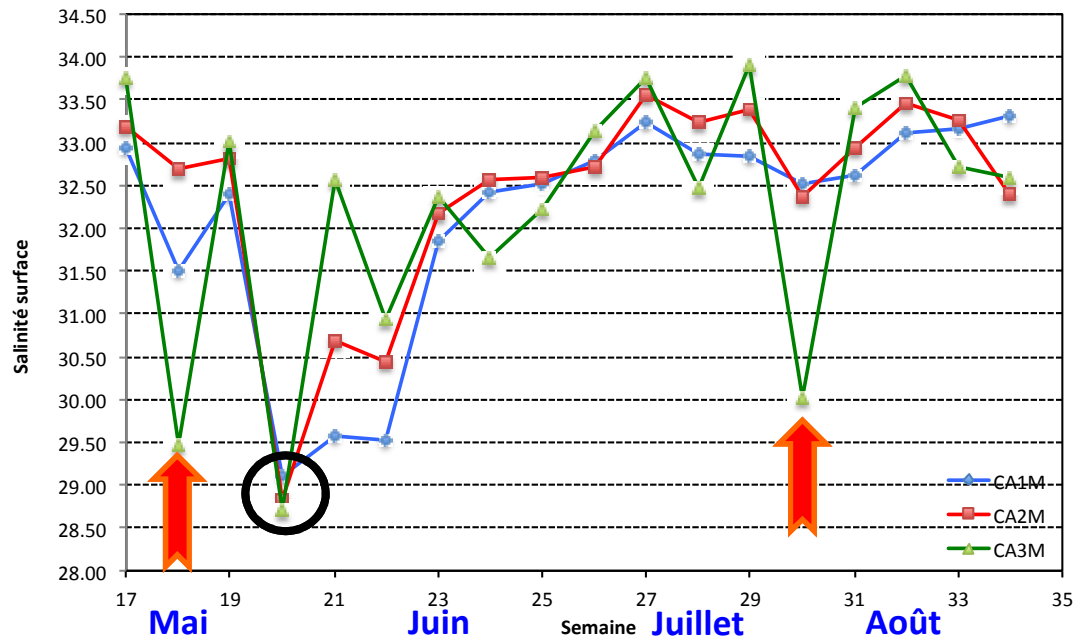
PREMIERS RESULTATS

Luc sur Mer

Salinité (surface)



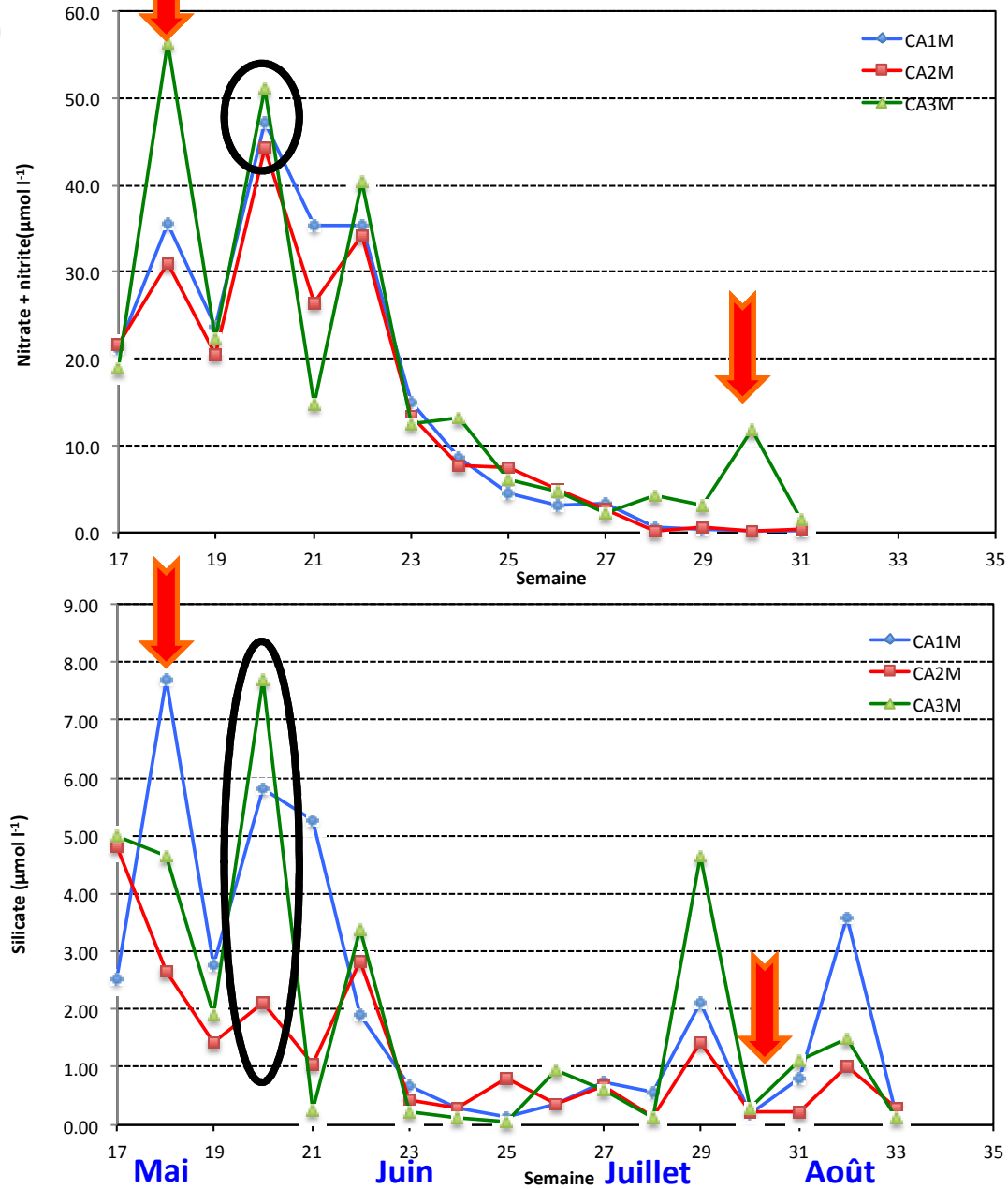
Cabourg



PREMIERS RESULTATS

Sels nutritifs (surface)

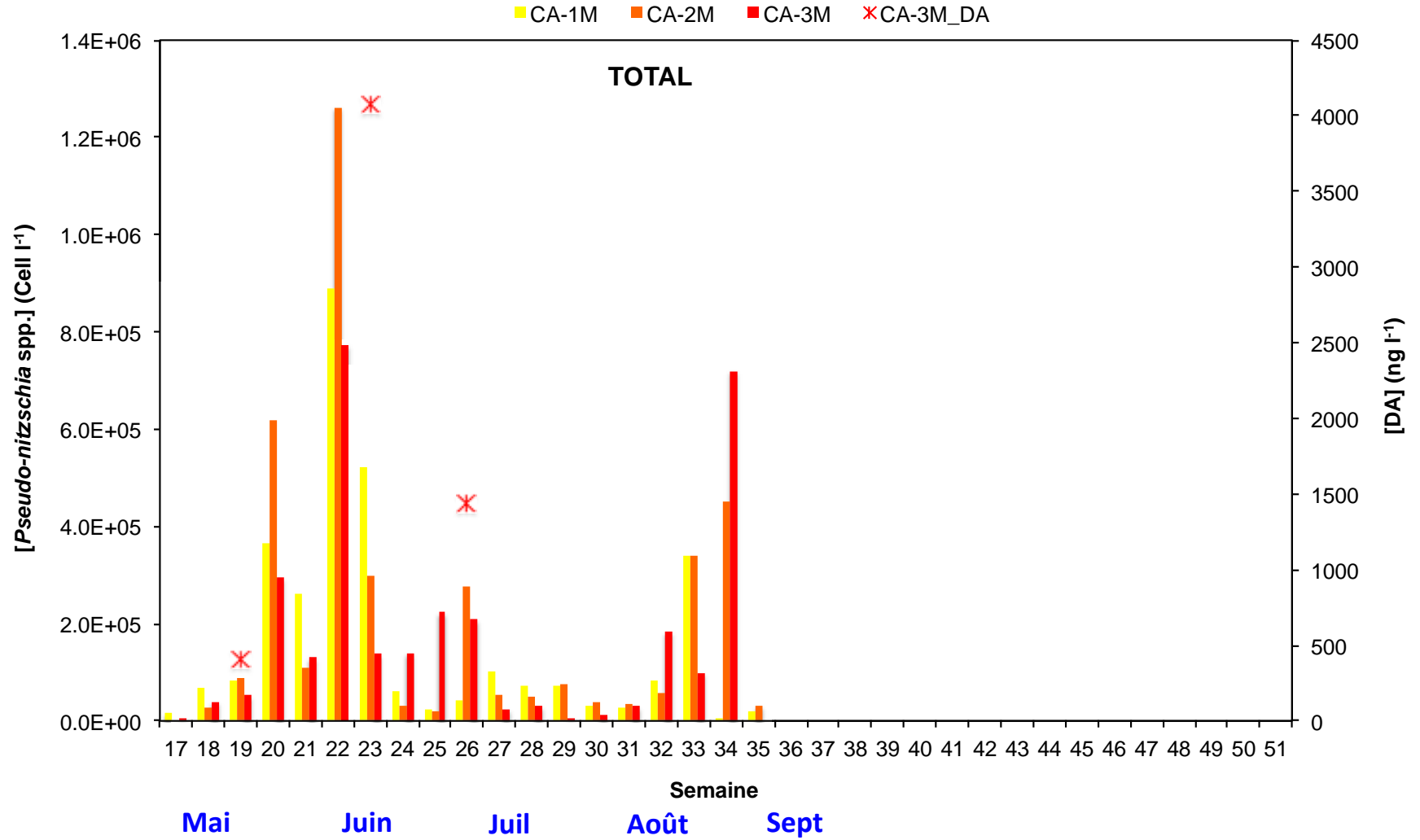
Cabourg



PREMIERS RESULTATS

Abondances
Pseudo-nitzschia - [DA] ng l⁻¹

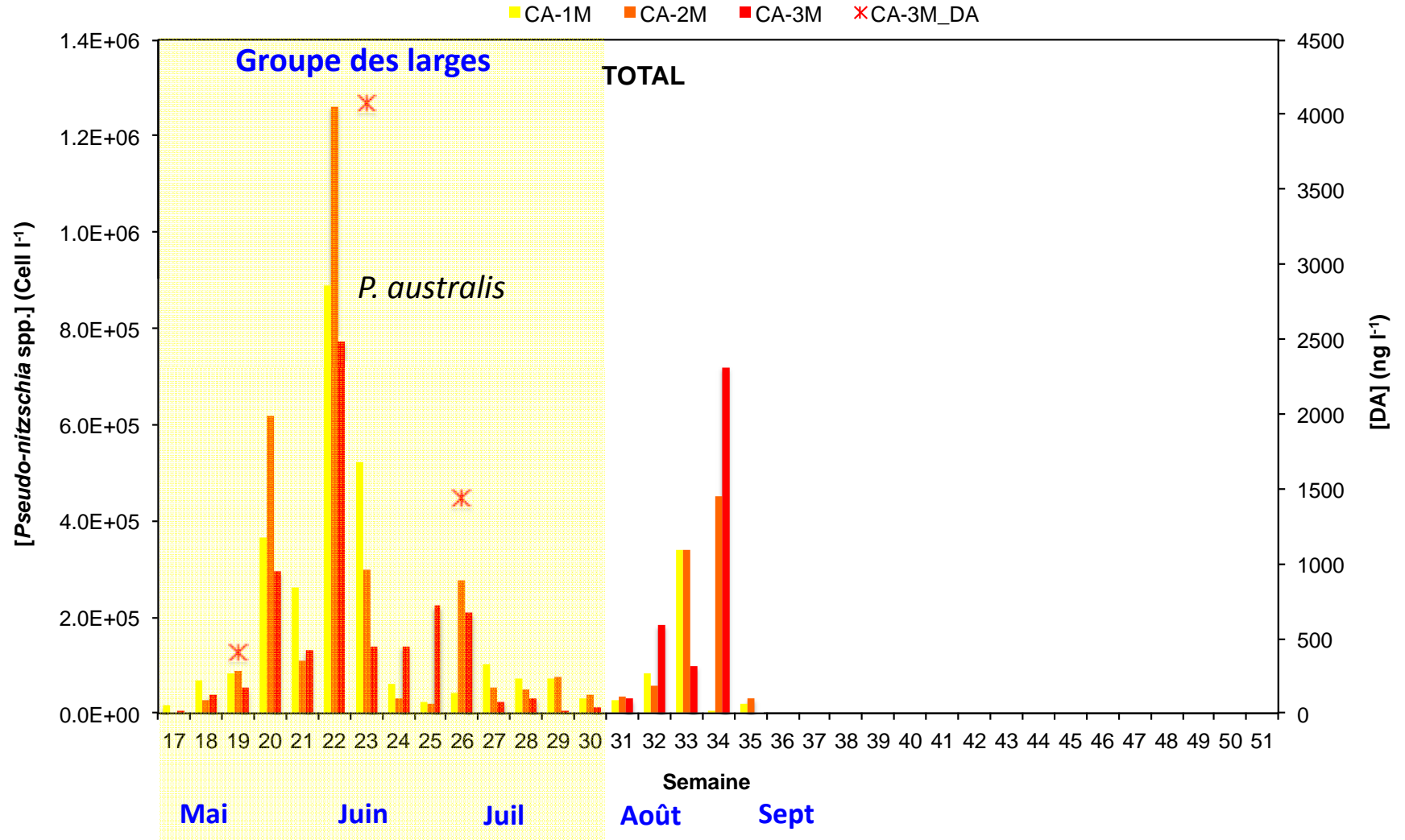
CABOURG



PREMIERS RESULTATS

Abondances
Pseudo-nitzschia - [DA] ng l⁻¹

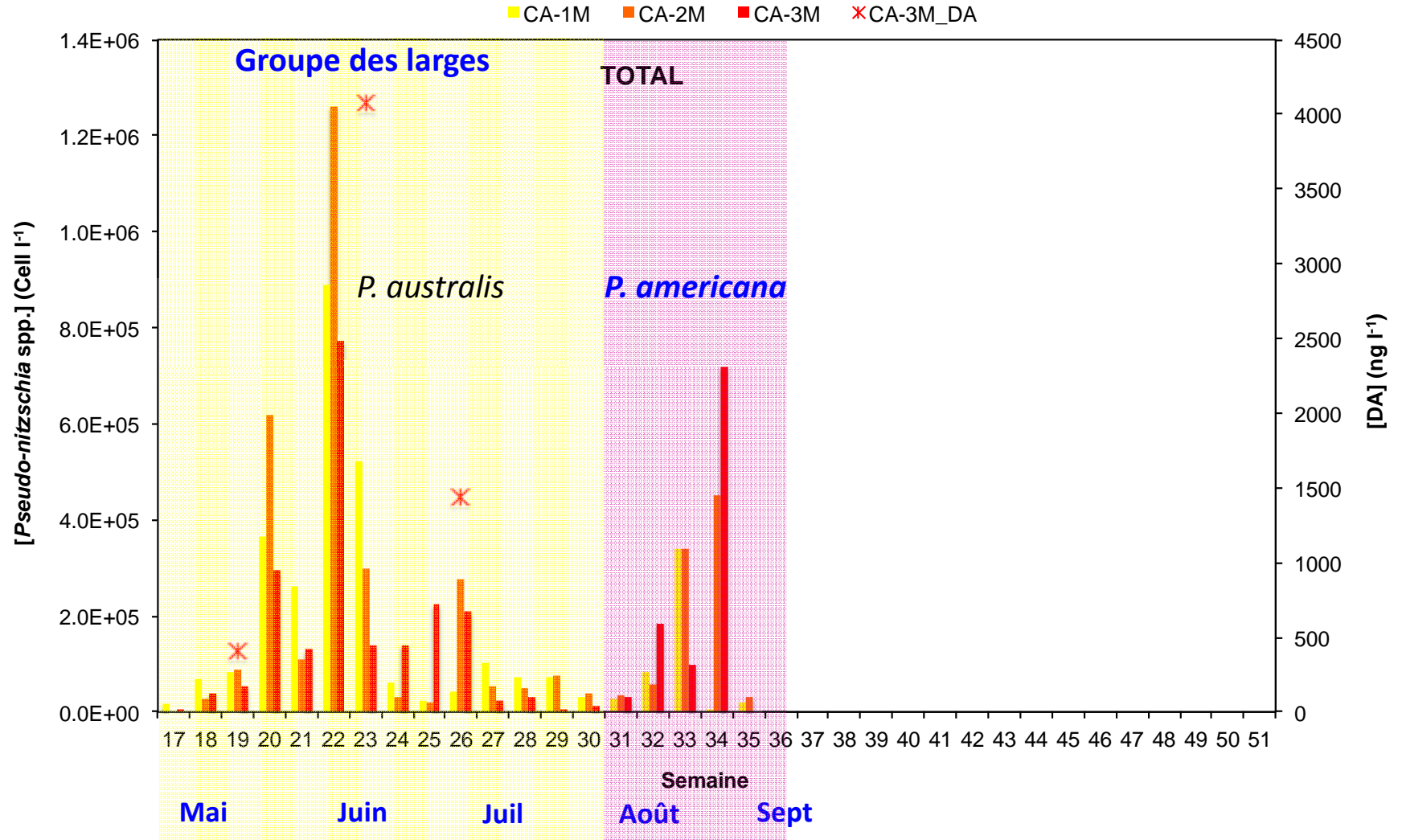
CABOURG



PREMIERS RESULTATS

Abondances
Pseudo-nitzschia - [DA] ng l⁻¹

CABOURG



Projet Liteau

Décembre 2012

Projet **FLAM** : ef**FL**orescences micro**Al**gales en **Manche** :
rôle des bassins versants sur le développement du
phytoplancton toxique

Ifremer – LERN

&

Ifremer - DYNECO BENTHOS

UMR Sisyphe, UPMC/CNRS

BioMea Université de Caen

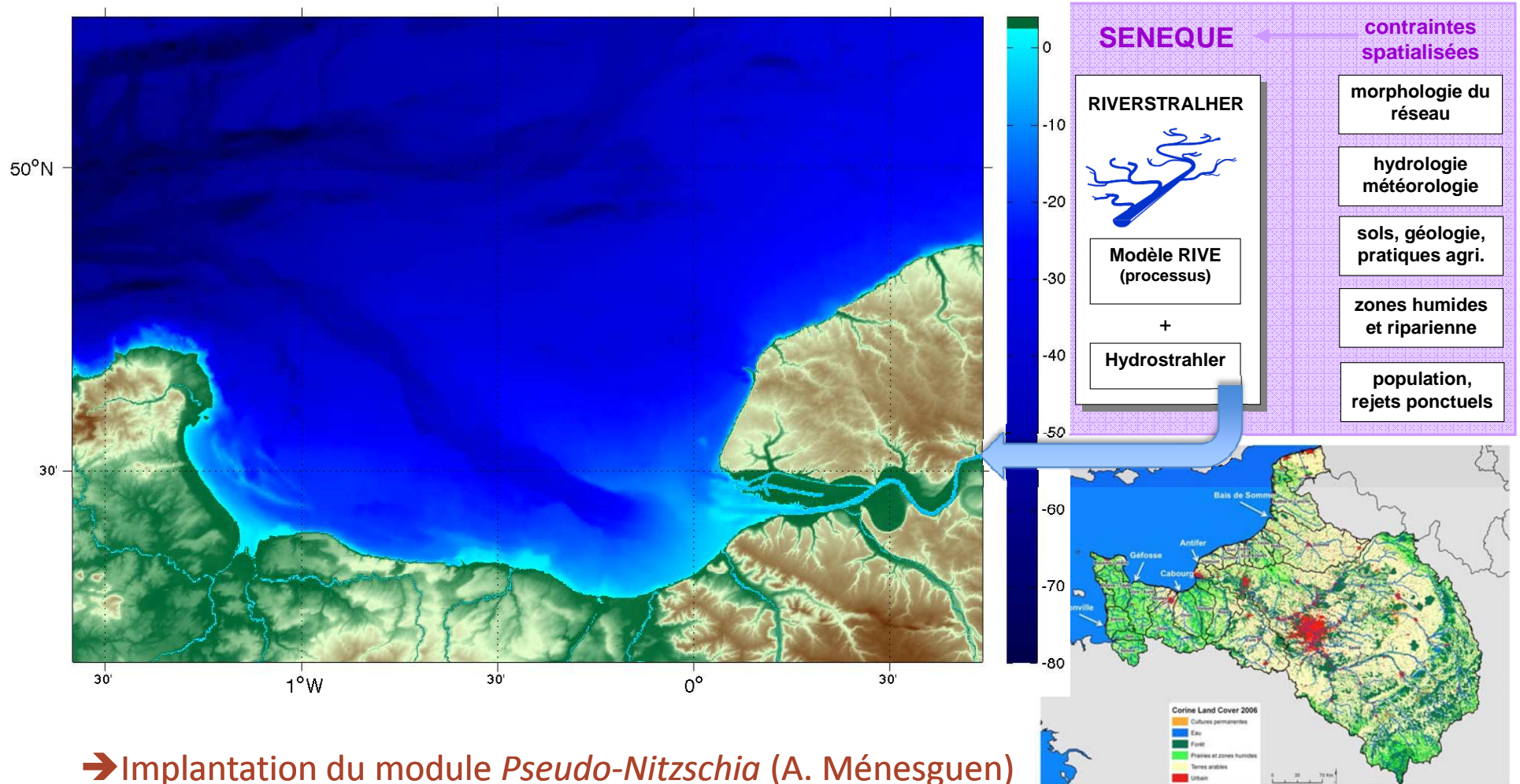
Missions publiques

Agence de l'Eau Seine Normandie

(AESN)

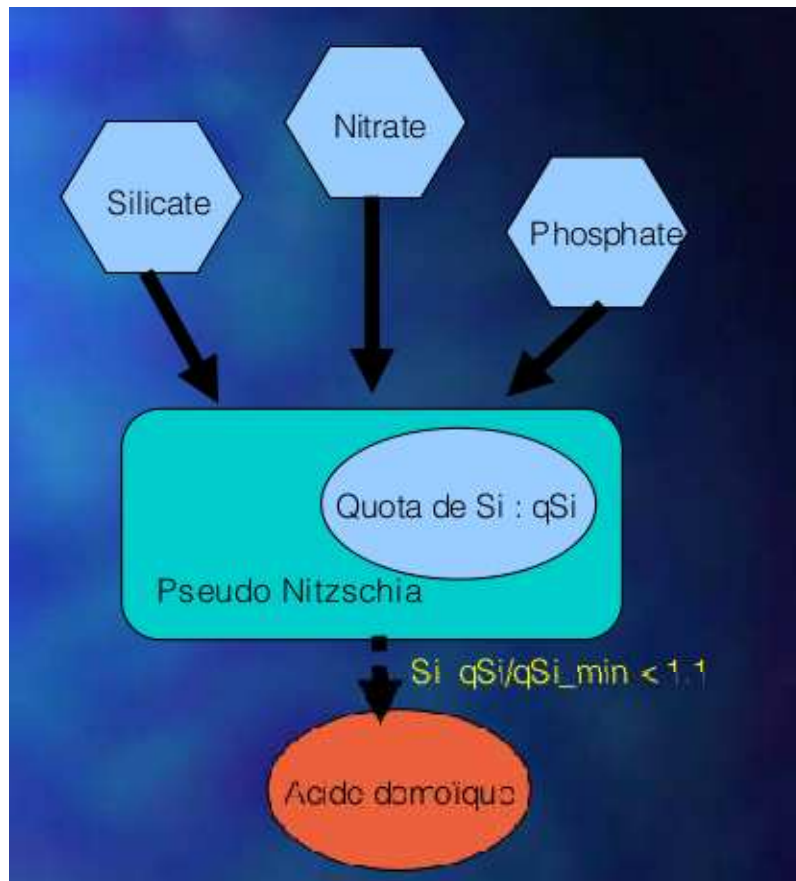


Utilisation du modèle bio Baie de Seine (500m) couplé avec Riverstrahler (Paris 6)



➔ Implantation du module *Pseudo-Nitzschia* (A. Ménesguen) dans le modèle Baie de Seine

AXE 2 : Chaîne de modélisation des continuums aquatiques

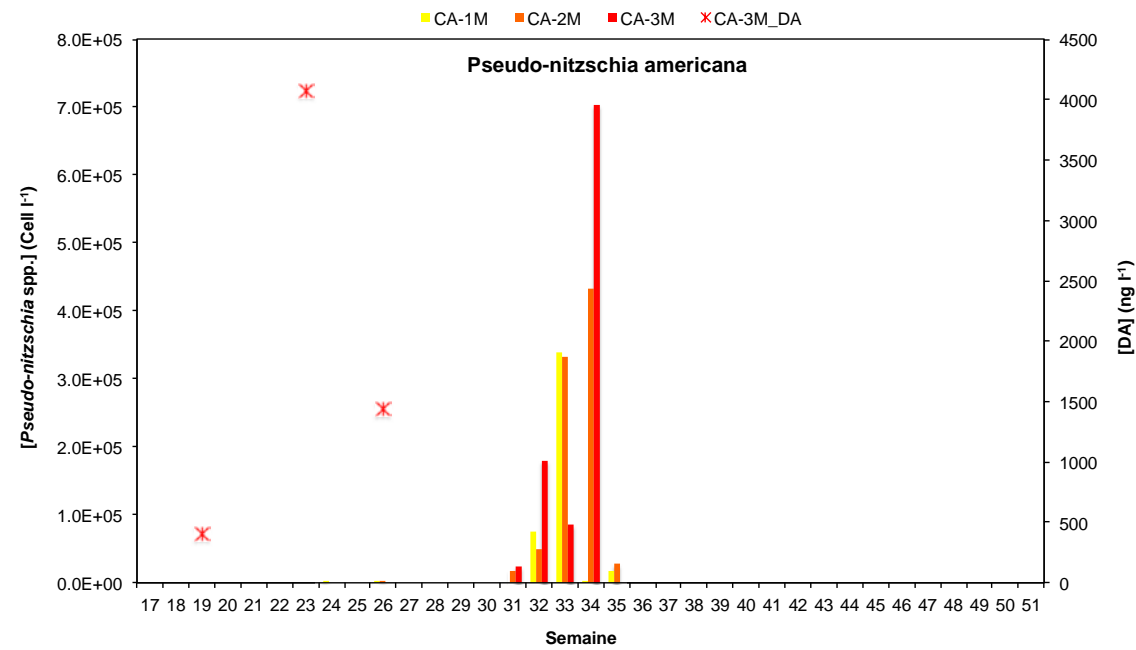
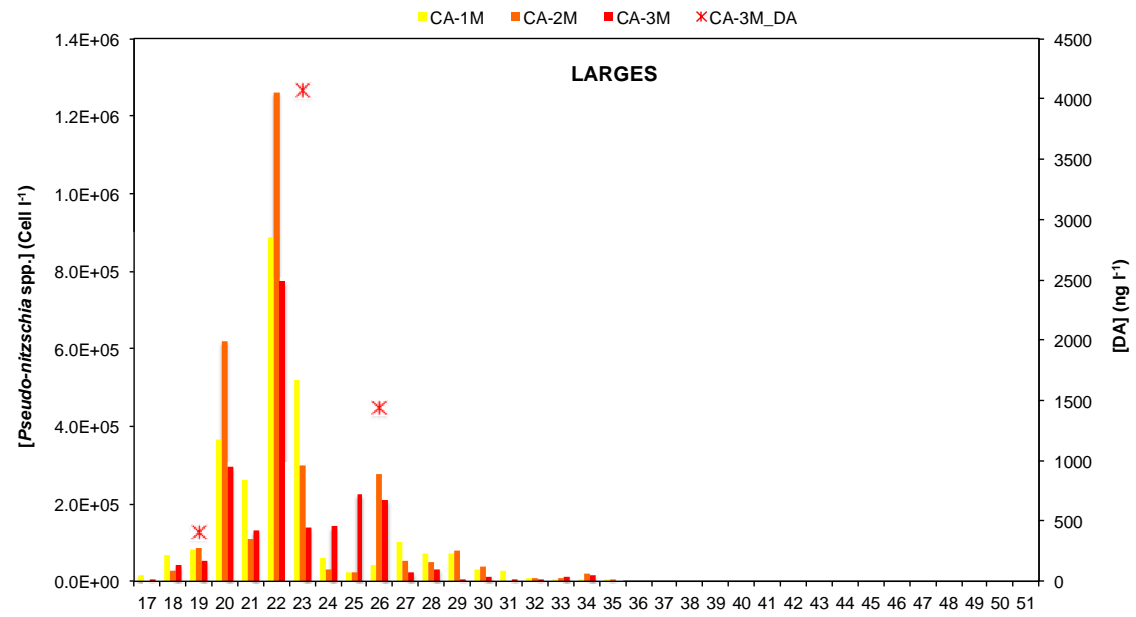


- Module *Pseudo-Nitzschia* : adapté du modèle de Davidson et Fehling (2006, African JoMS)
- Hypothèse utilisée par ce module : la toxicité apparaît quand le quota interne de silicium des cellules est bas

MAIS

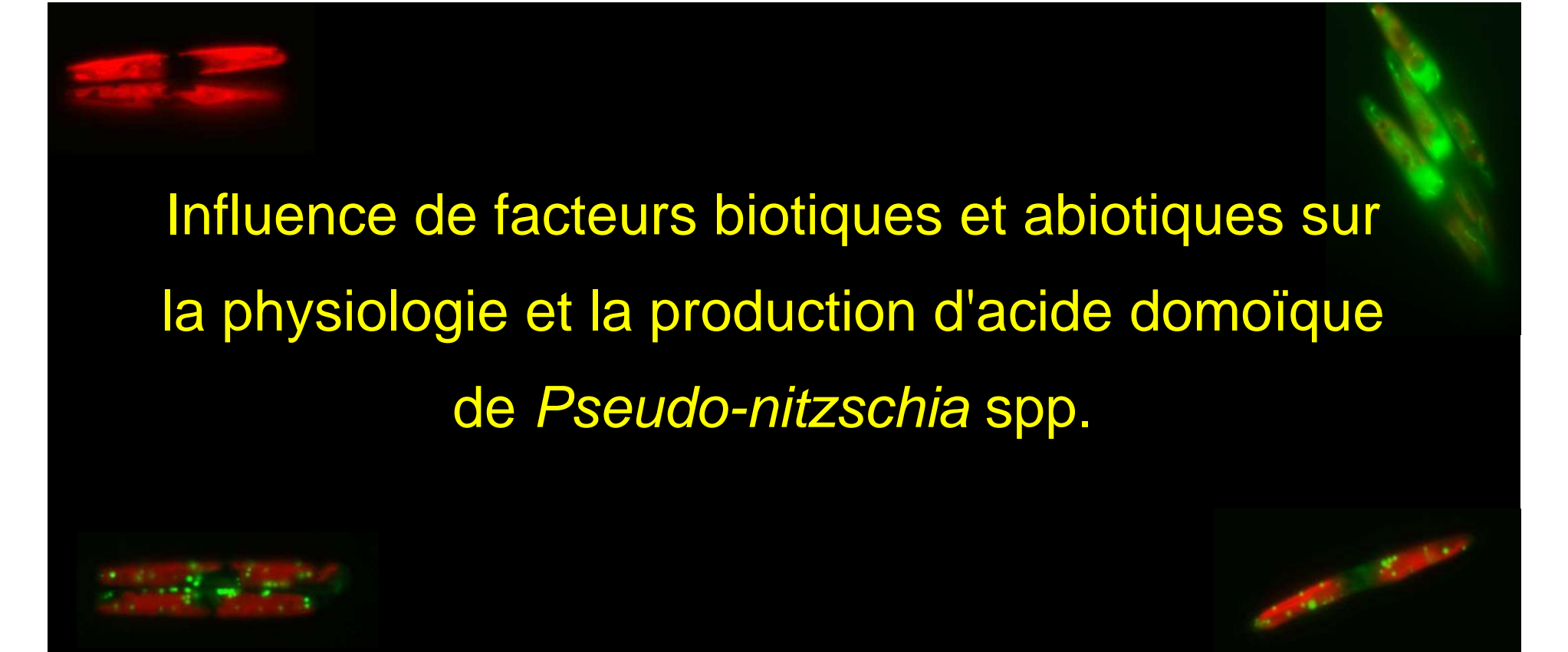
- module générique (une seule variable représentant tout le genre PN)
- production d'acide domoïque uniquement liée à une limitation en Si
- pas de jeu de données adaptées à la validation de ce module (acide domoïque/reconnaissance d'espèces/suivi temporel) → **TAPAS**

Module Pseudo-Nitzschia



Influence de facteurs biotiques et abiotiques
sur la physiologie et la production d'acide domoïque
de *Pseudo-nitzschia* spp.

Aurélie Lelong, Hélène Hégaret & Philippe Soudant
IUEM-LEMAR-UBO, Brest

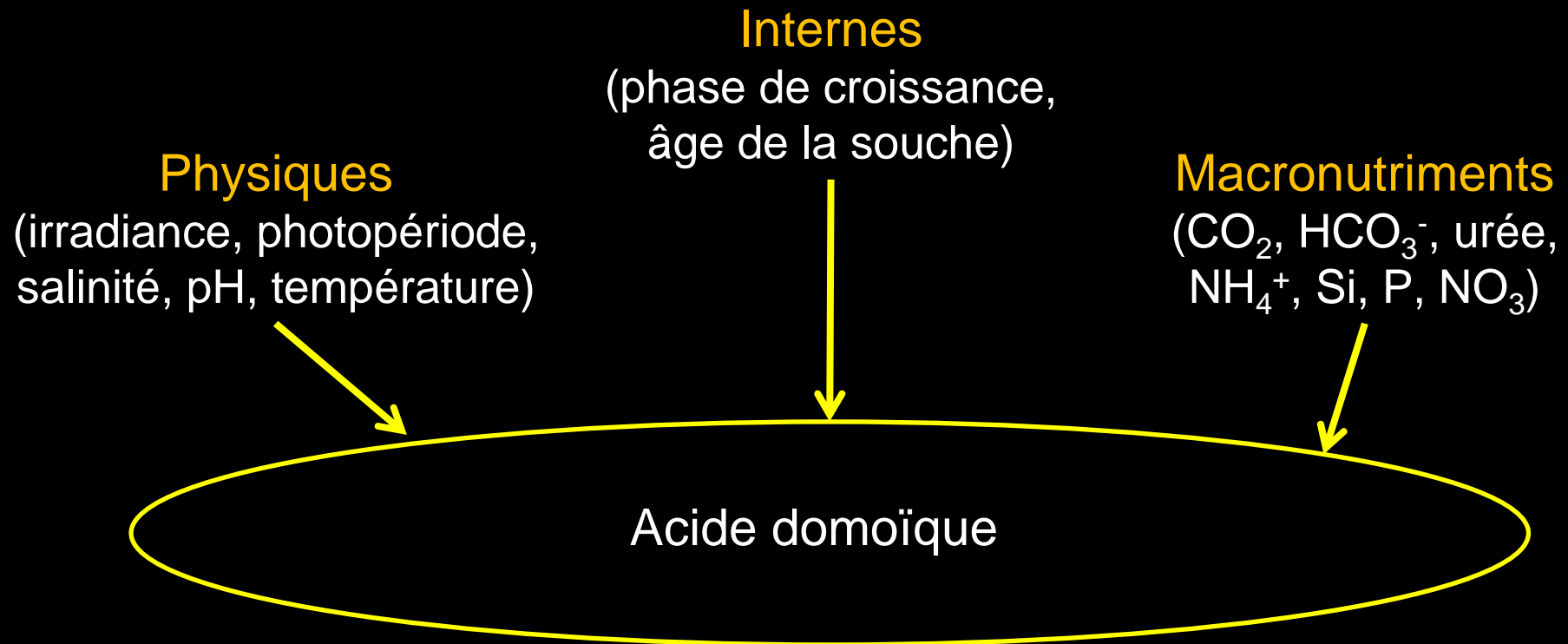


Influence de facteurs biotiques et abiotiques sur
la physiologie et la production d'acide domoïque
de *Pseudo-nitzschia* spp.

Aurélie LELONG, Hélène HEGARET & Philippe SOUDANT



Introduction générale



Phycologia (2011) Volume 50 (6), 000–000

Published XXX XXX 2011

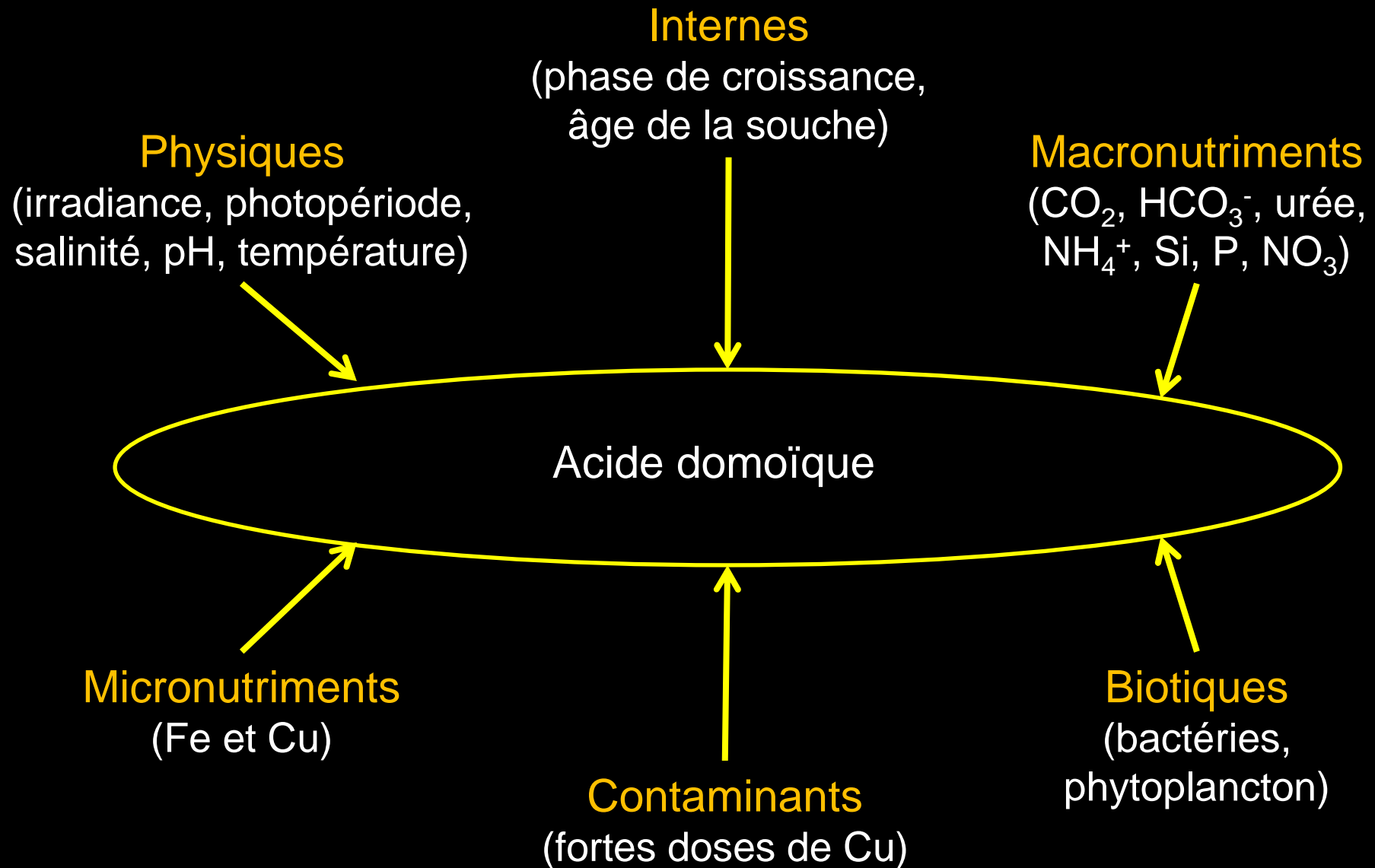
***Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) species, domoic acid and amnesic shellfish poisoning: revisiting previous paradigms**

AURÉLIE LELONG¹, HÉLÈNE HÉGARET¹, PHILIPPE SOUDANT¹ AND STEPHEN S. BATES^{2*}

¹LEMAR UMR 6539, IUEM-UBO, Place Nicolas Copernic, Plouzané, France

²Fisheries and Oceans Canada, Gulf Fisheries Centre, Moncton, NB, Canada E1C 9B6

Introduction générale



Problématique

AD = chélatant de certains métaux traces → rôle dans leur acquisition
(limitations, compétition) et/ou protection contre les métaux ?

AD = métabolite secondaire → dépend de l'état physiologique des cellules.

Objectif :

**mieux comprendre le rôle de l'AD dans la physiologie
cellulaire et son implication dans l'écologie de cette espèce.**

Approches:

1 : caractériser l'état physiologique.

**2 : tester l'effet de facteurs biotiques et abiotiques sur la physiologie et la
production d'AD.**

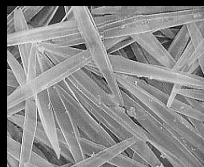
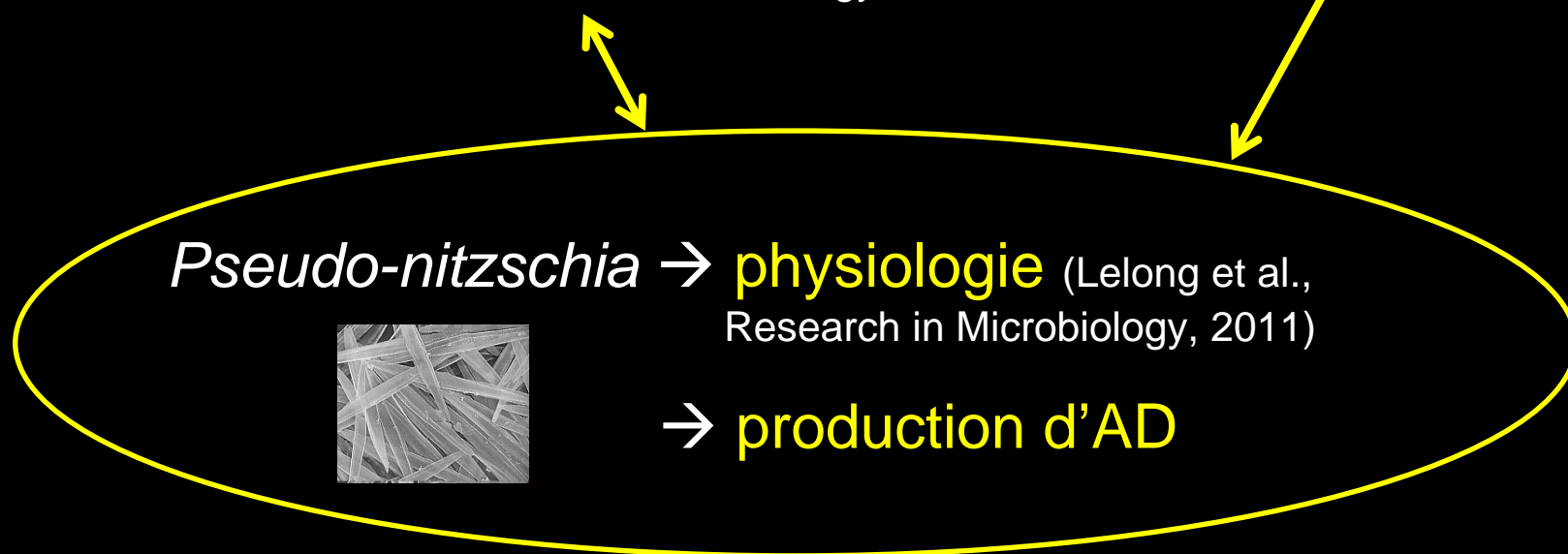
Problématique



Interaction (avec une diatomée sympatrique)
(Lelong *et al.*, to be submitted, Applied and Environmental Microbiology)

Bactéries

(Lelong *et al.*, to be submitted, Harmful Algae)



→ **production d'AD**



Toxicité Cu

(Lelong *et al.*, Aquatic Toxicology 2012)



Plan

2. Matériel et méthodes

3. Résultats

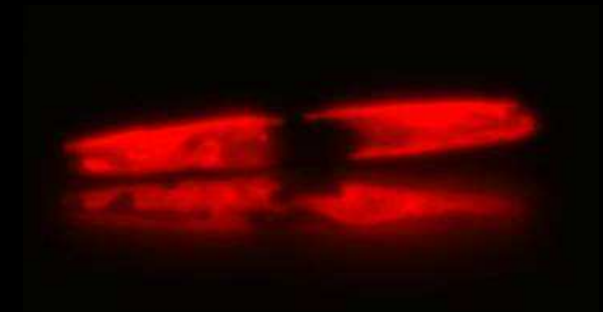
3.1. Physiologie cellulaire

3.2. Interaction avec une diatomée sympatrique

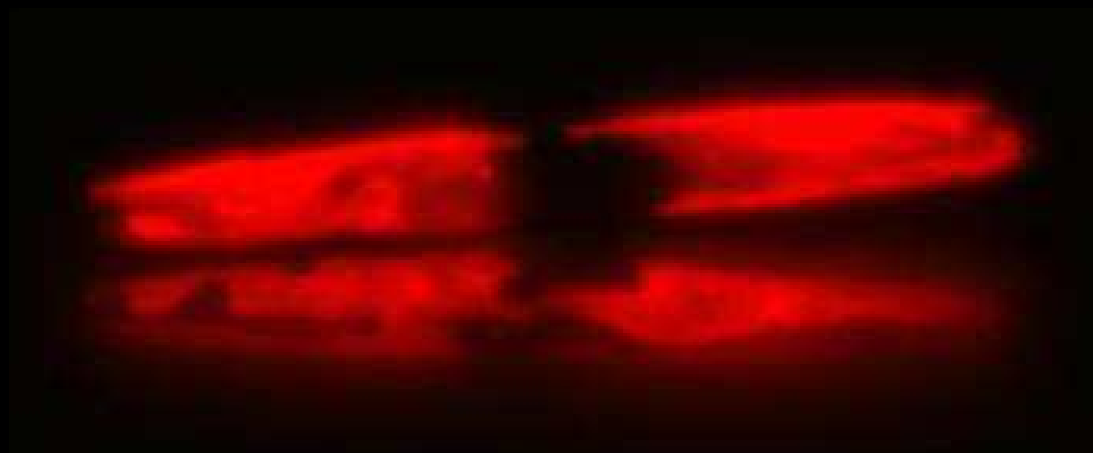
3.3. Interaction avec les bactéries

3.4. Toxicité cuivre

4. Conclusions et perspectives



Matériel et méthodes



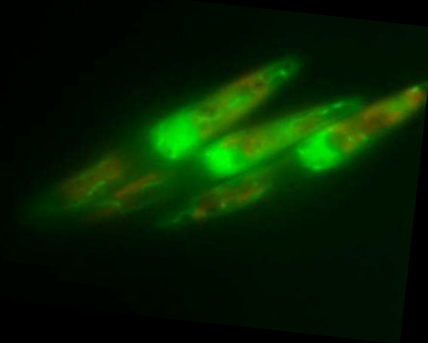
Outils de mesure physiologique



Photosynthèse → QY, FL3
(contenu en chlorophylle)



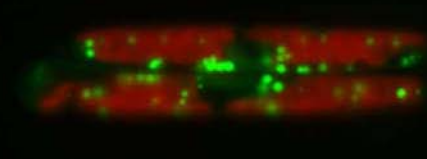
Energie disponible



Métabolisme primaire →
activité des estérases (FDA)

Division →
comptage
cellulaire et
viabilité (SYTOX
Green)

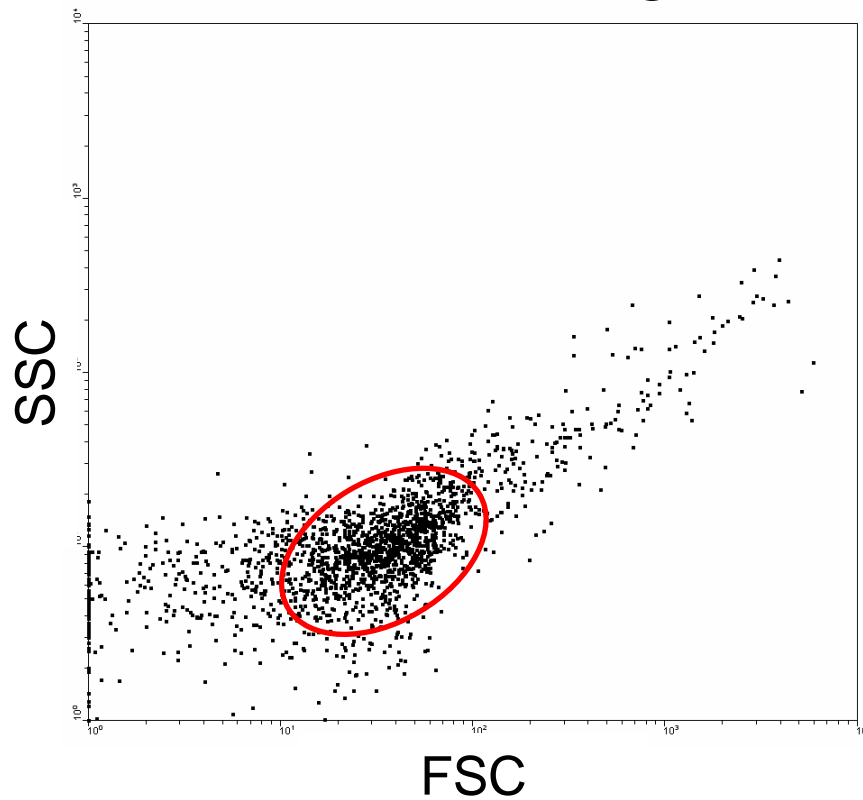
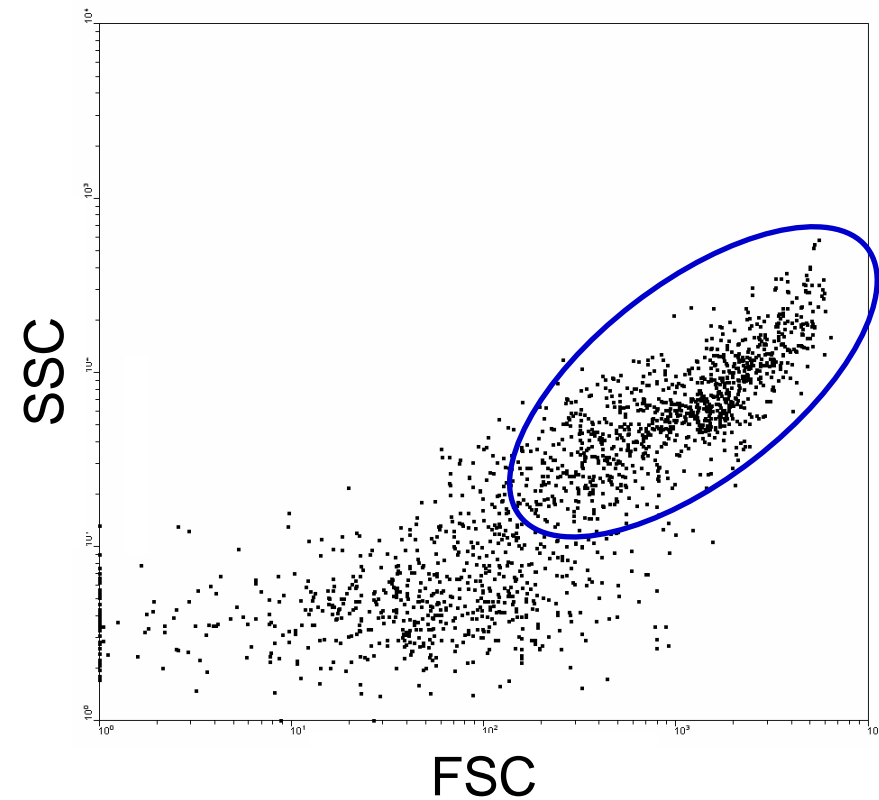
Métabolisme
secondaire →
production d'AD (kit
ELISA)

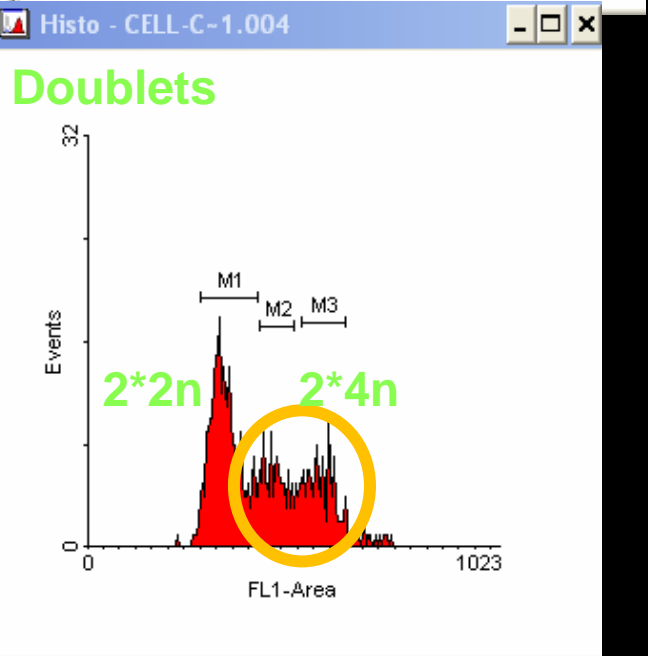
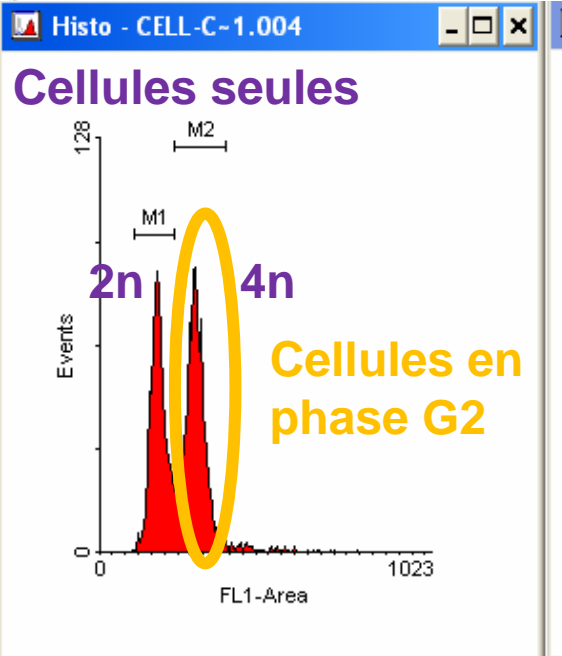
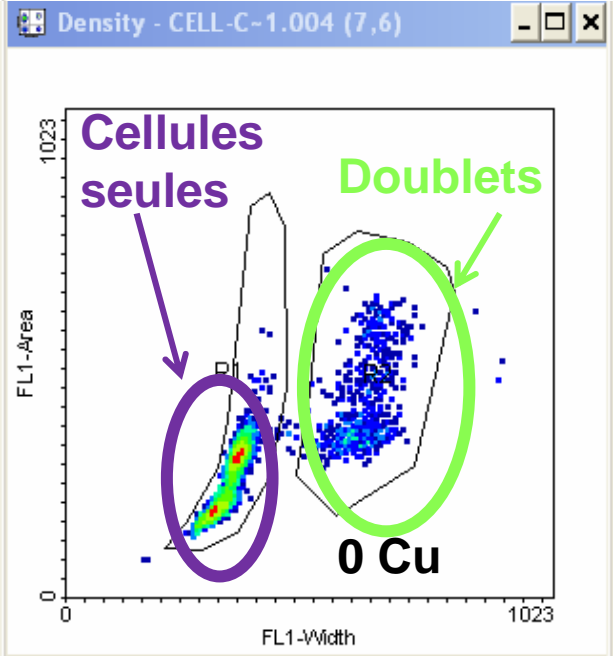
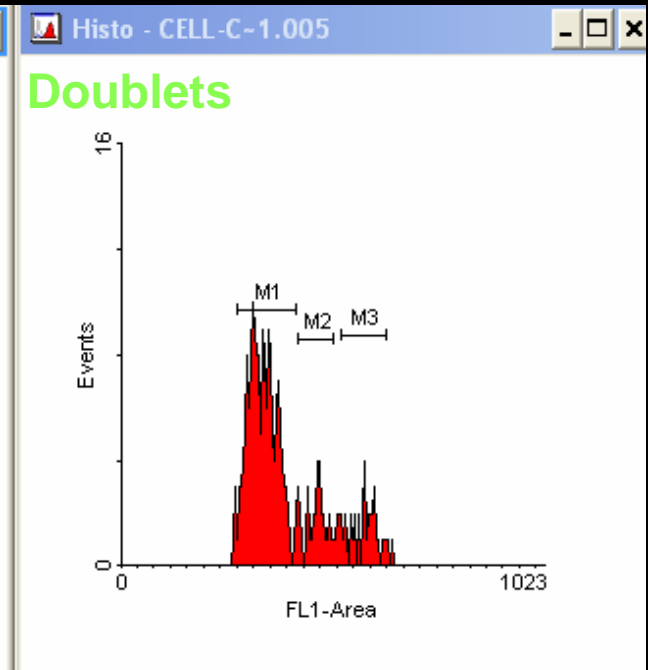
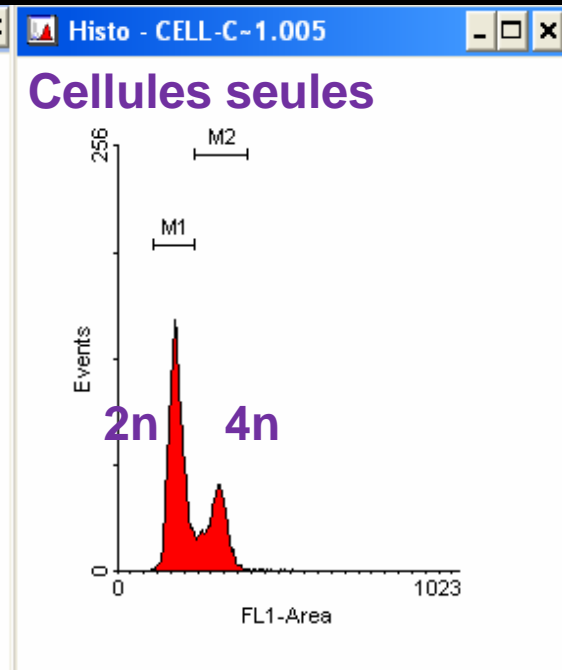
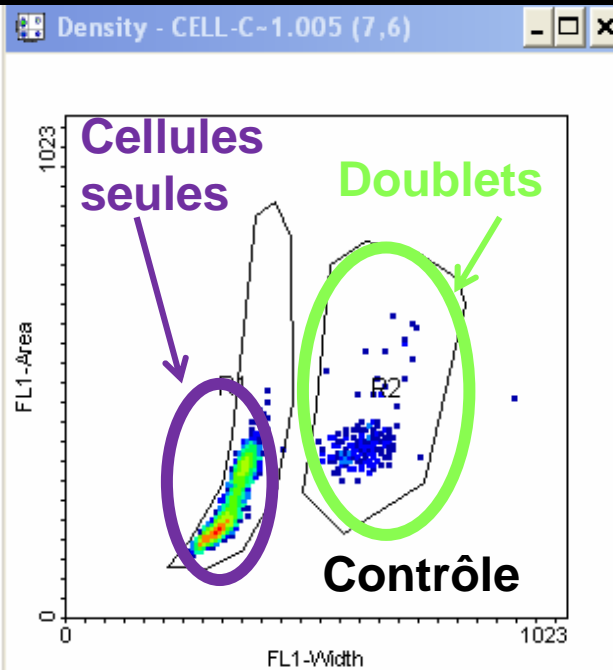


Stockage
d'énergie
(lipides de
réserve,
BODIPY)

Outils de mesure physiologique

Bactéries → comptage et mortalité (SYBR Green I, Iodure de Propidium)
→ différentes populations observées suivant leur "morphologie"

Bactéries de *C. neogracile*Bactéries de *P. multiseriis*



Espèces modèles

Espèces modèles :

Pseudo-nitzschia multiseriis CCAP 1061/32 ou CLNN-16

→ productrice d'acide domoïque

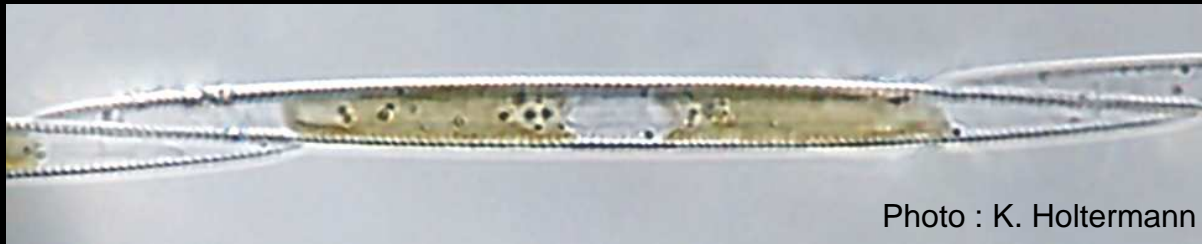


Photo : K. Holtermann

Pseudo-nitzschia delicatissima Pd08RB

→ non productrice d'acide domoïque



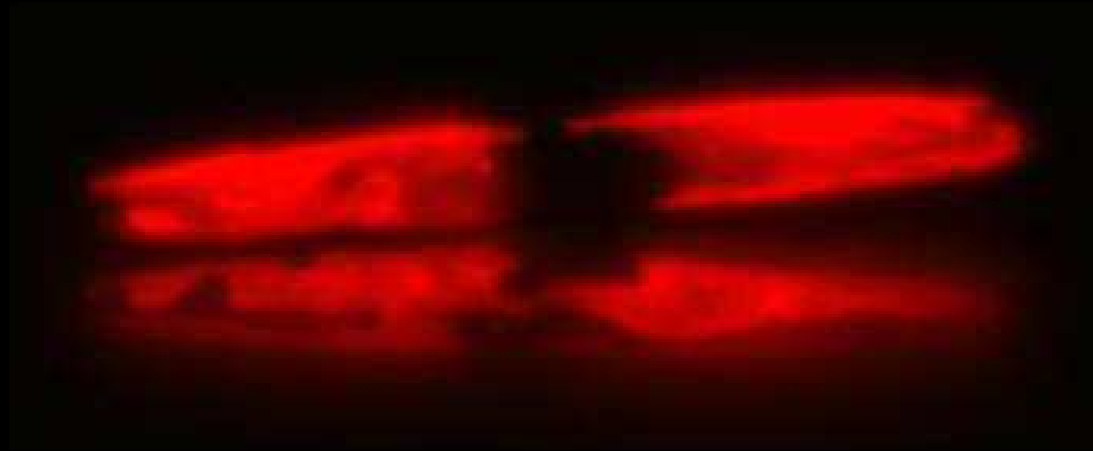
Photo : A. Lelong

Chaetoceros neogracile CCAP 1010/3

→ diatomée non productrice d'acide domoïque



Résultats



3.1. Physiologie cellulaire



Objectif : mieux comprendre et caractériser les variations physiologiques observées chez *P. multiseriata*.

- Culture en conditions "normales"
- Suivi sur la totalité de la croissance
- Mesures physiologiques



Research in Microbiology 162 (2011) 969–981



www.elsevier.com/locate/resmic

Cell-based measurements to assess physiological status of *Pseudo-nitzschia multiseriata*, a toxic diatom

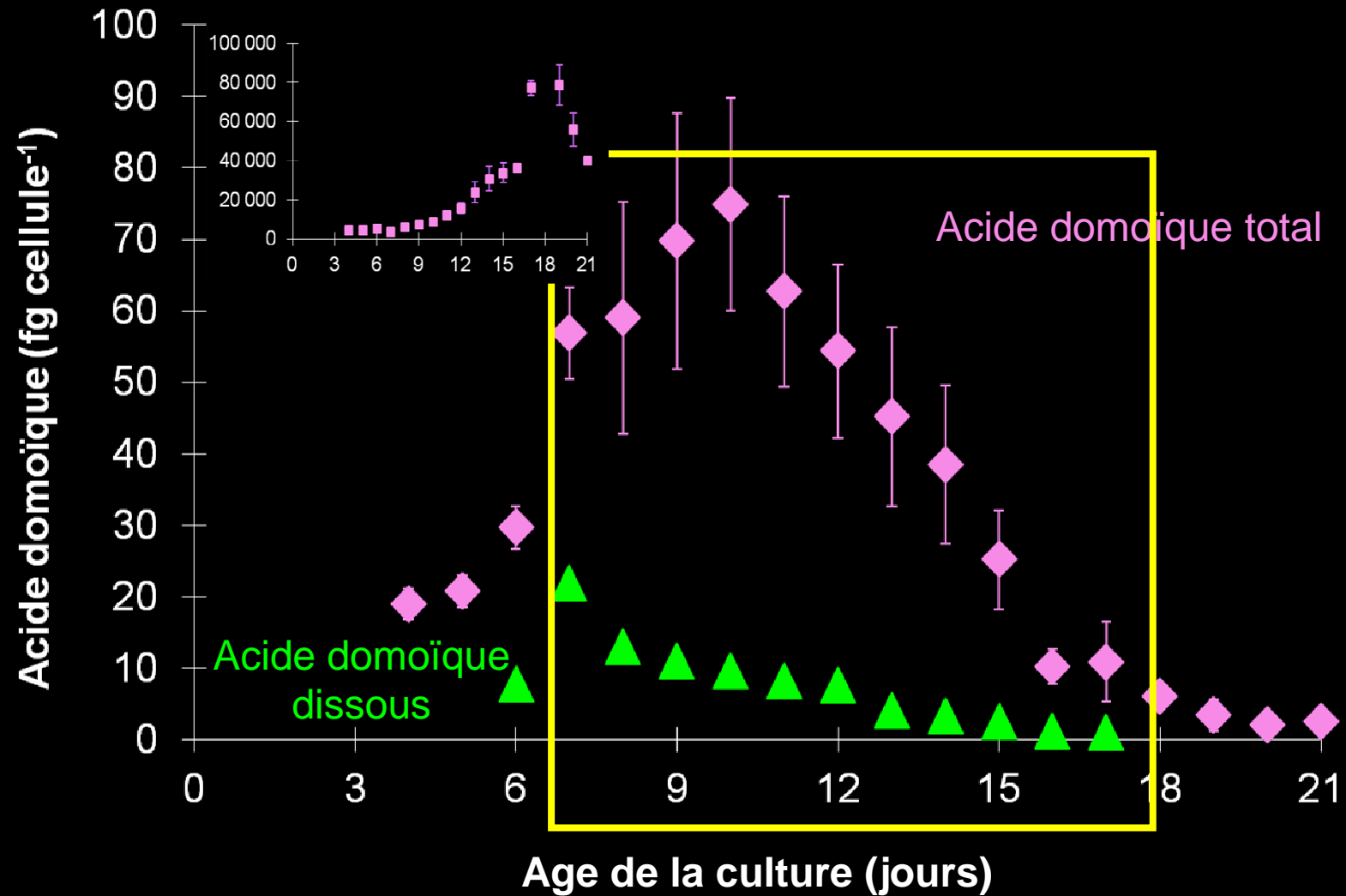
Aurélie Lelong, Hélène Hégaret, Philippe Soudant*

LEMAR (UMR6539), IUEM, Place Nicolas Copernic, 29280 Plouzané, France

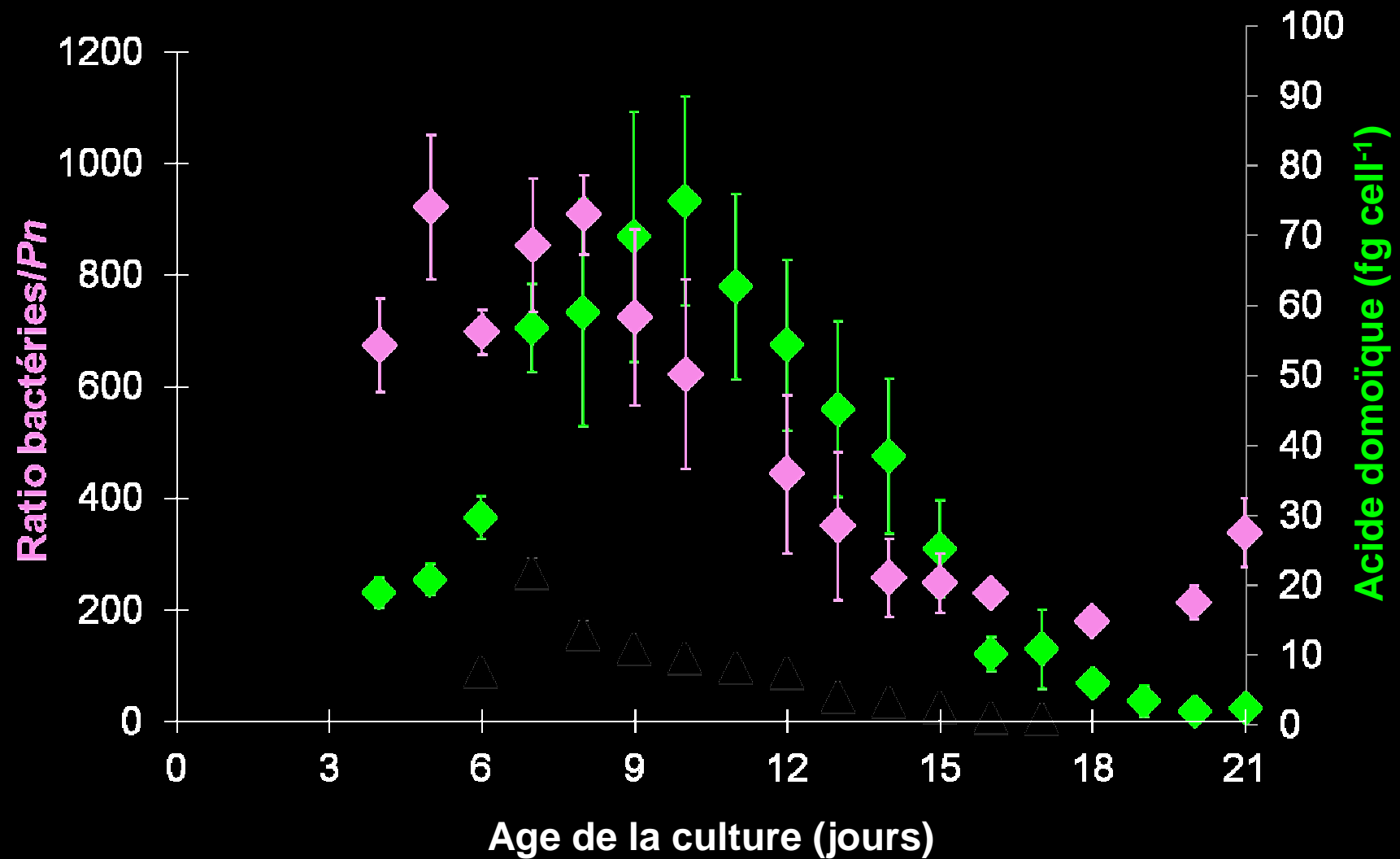
Received 5 January 2011; accepted 9 May 2011

Available online 13 June 2011

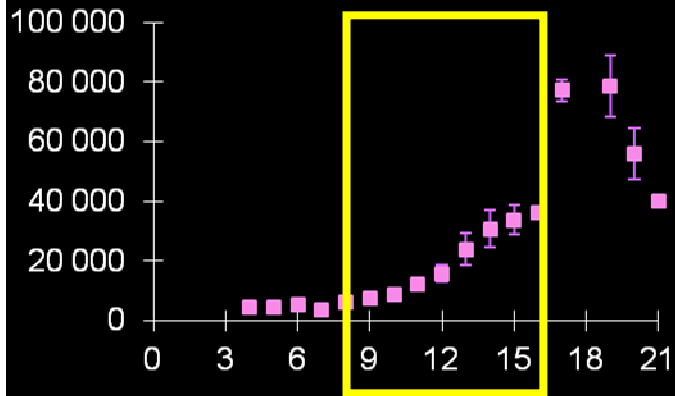
3.1. Physiologie cellulaire

Acide domoïque = métabolisme secondaire

3.1. Physiologie cellulaire

Ratio bactéries/*P. multiseri*

3.1. Physiologie cellulaire



Photosynthèse

Energie disponible

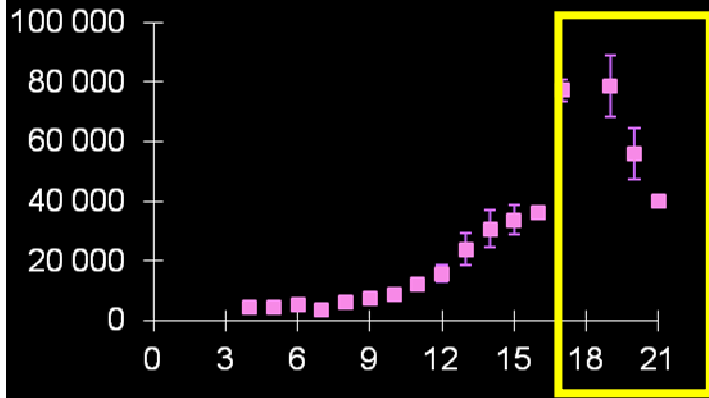
Métabolisme primaire

Division

Métabolisme secondaire

Stockage d'énergie (lipides)

3.1. Physiologie cellulaire



Photosynthèse

Energie disponible

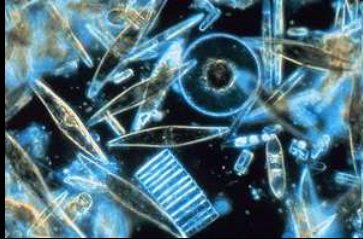
Carence(s)

Métabolisme primaire

Division

Métabolisme secondaire

Stockage d'énergie (lipides)

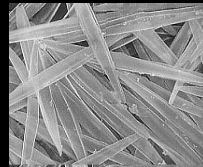
3.2. Interaction *Pseudo-nitzschia* - *Chaetoceros neogracile*

Interaction (avec une diatomée sympatrique)

(Lelong *et al.*, to be submitted, Applied and Environmental Microbiology)



Pseudo-nitzschia → **physiologie** (Lelong *et al.*,
Research in Microbiology, 2011)



→ **production d'AD**

3.2. Interaction *Pseudo-nitzschia* - *Chaetoceros neogracile*

Pseudo-nitzschia côtoie de nombreuses espèces en milieu naturel, dont *Chaetoceros* spp.

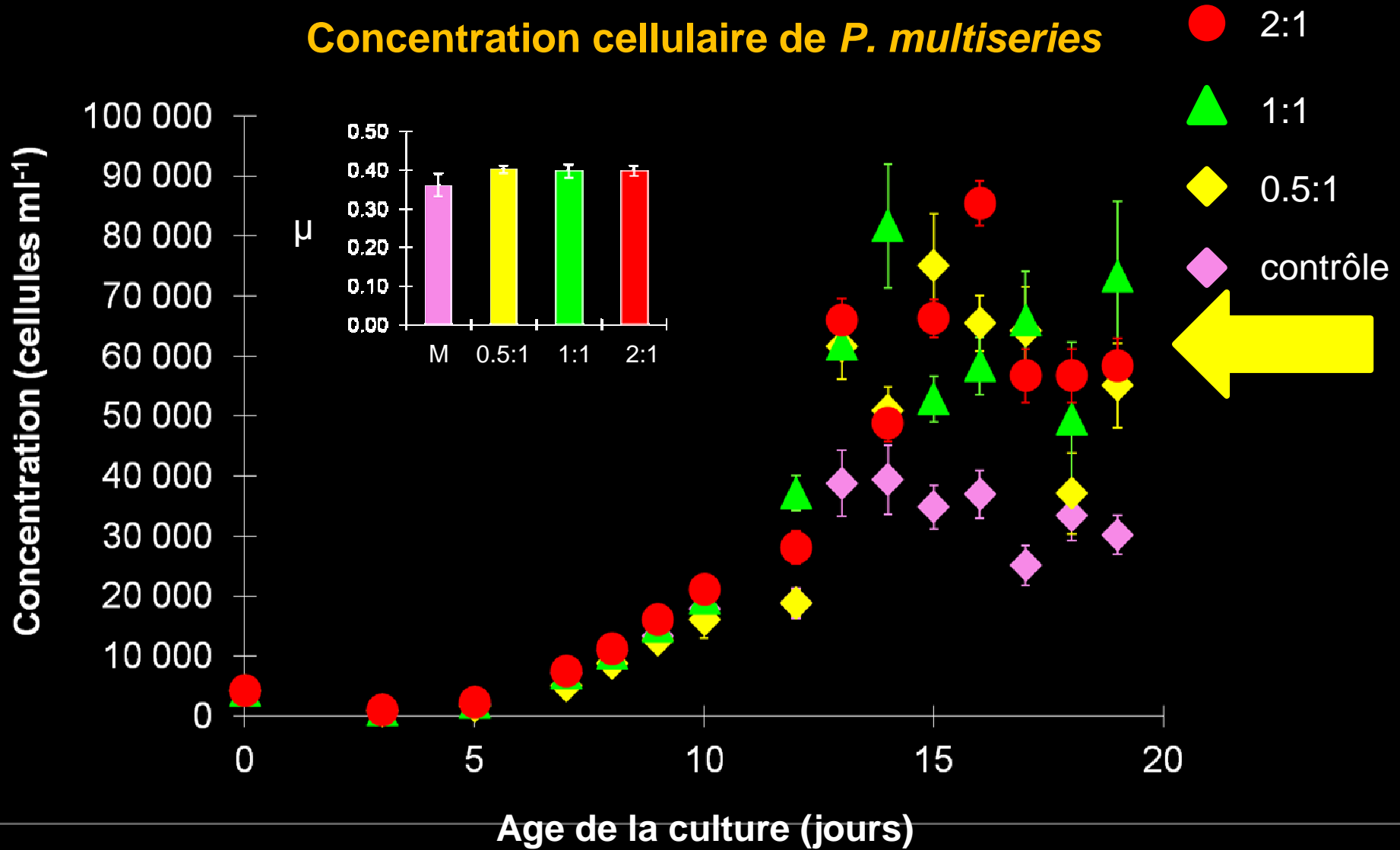
REPHY, Rade de Brest, année 2010



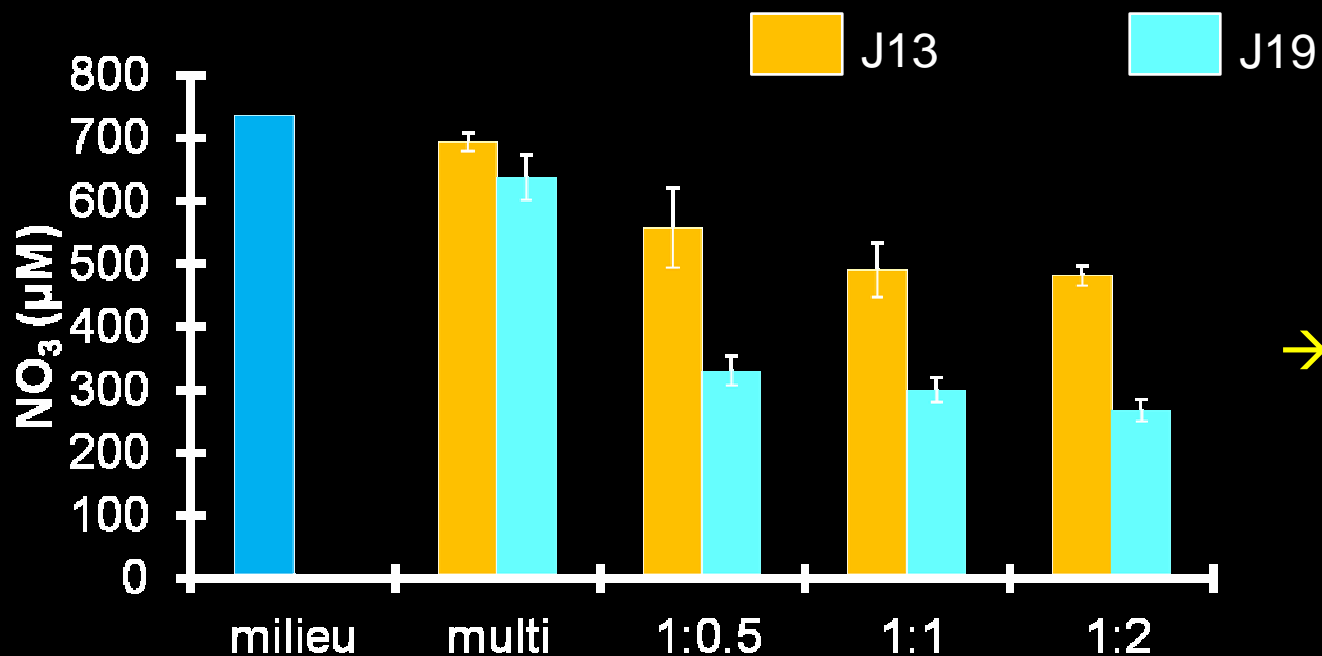
→ L'interaction entre ces deux espèces induit-elle des modifications physiologiques, dont la production d'AD ?

3.2. Interaction *Pseudo-nitzschia* - *Chaetoceros neogracile*

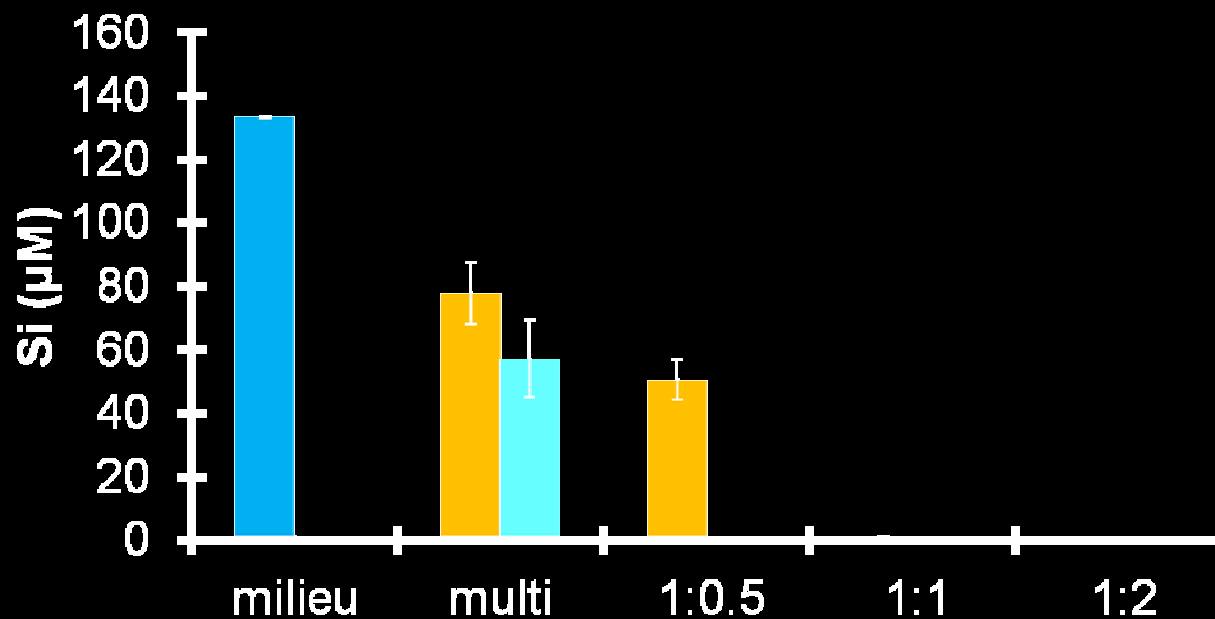
Concentration cellulaire de *P. multiseriis*



→ Concentration maximale plus importante

3.2. Interaction *Pseudo-nitzschia* - *Chaetoceros neogracile*

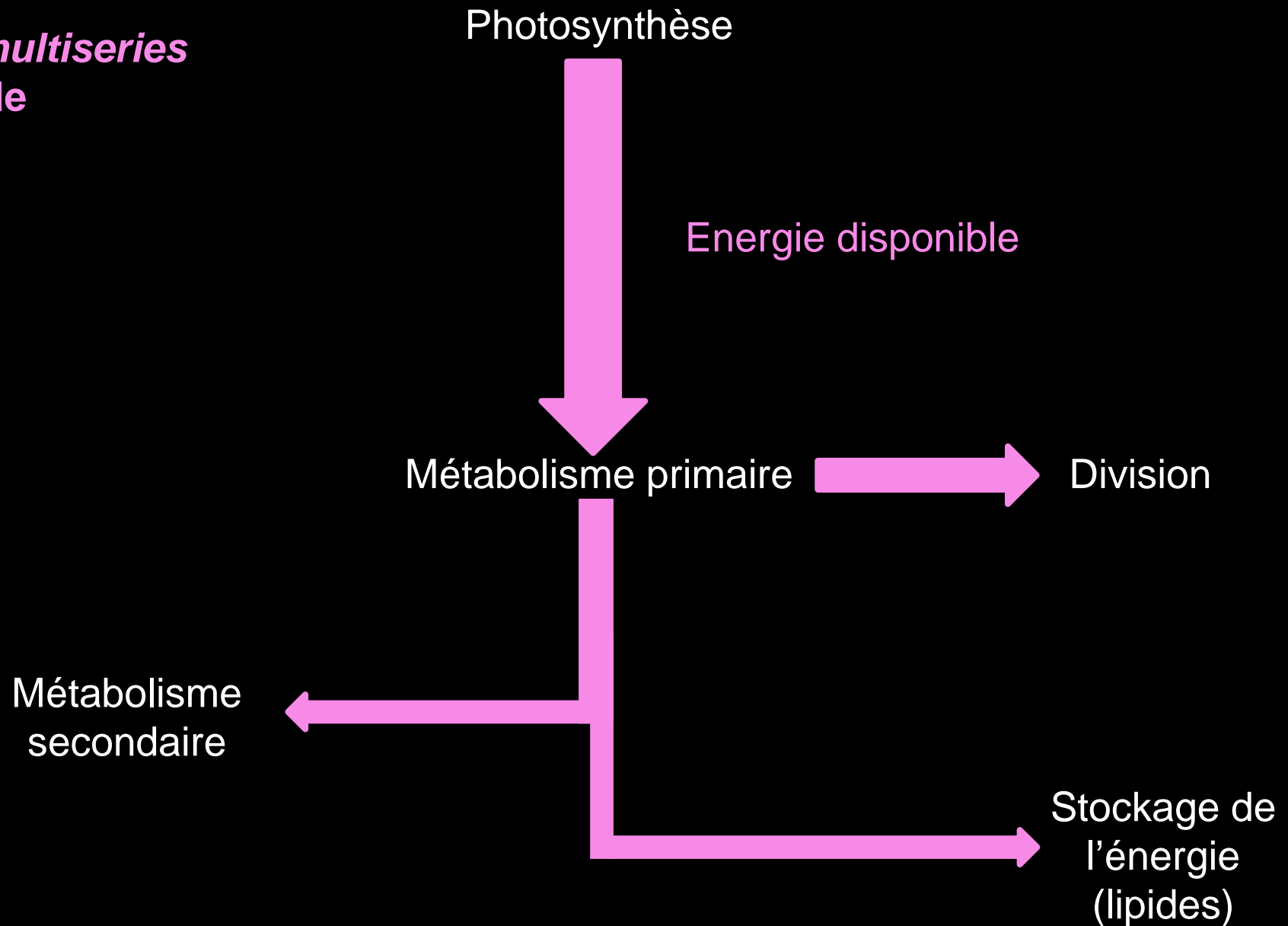
→ Pas de limitation NO_3^-



→ Limitation Si dans les co-cultures à la fin de la phase exponentielle

3.2. Interaction *Pseudo-nitzschia* - *Chaetoceros neogracile*

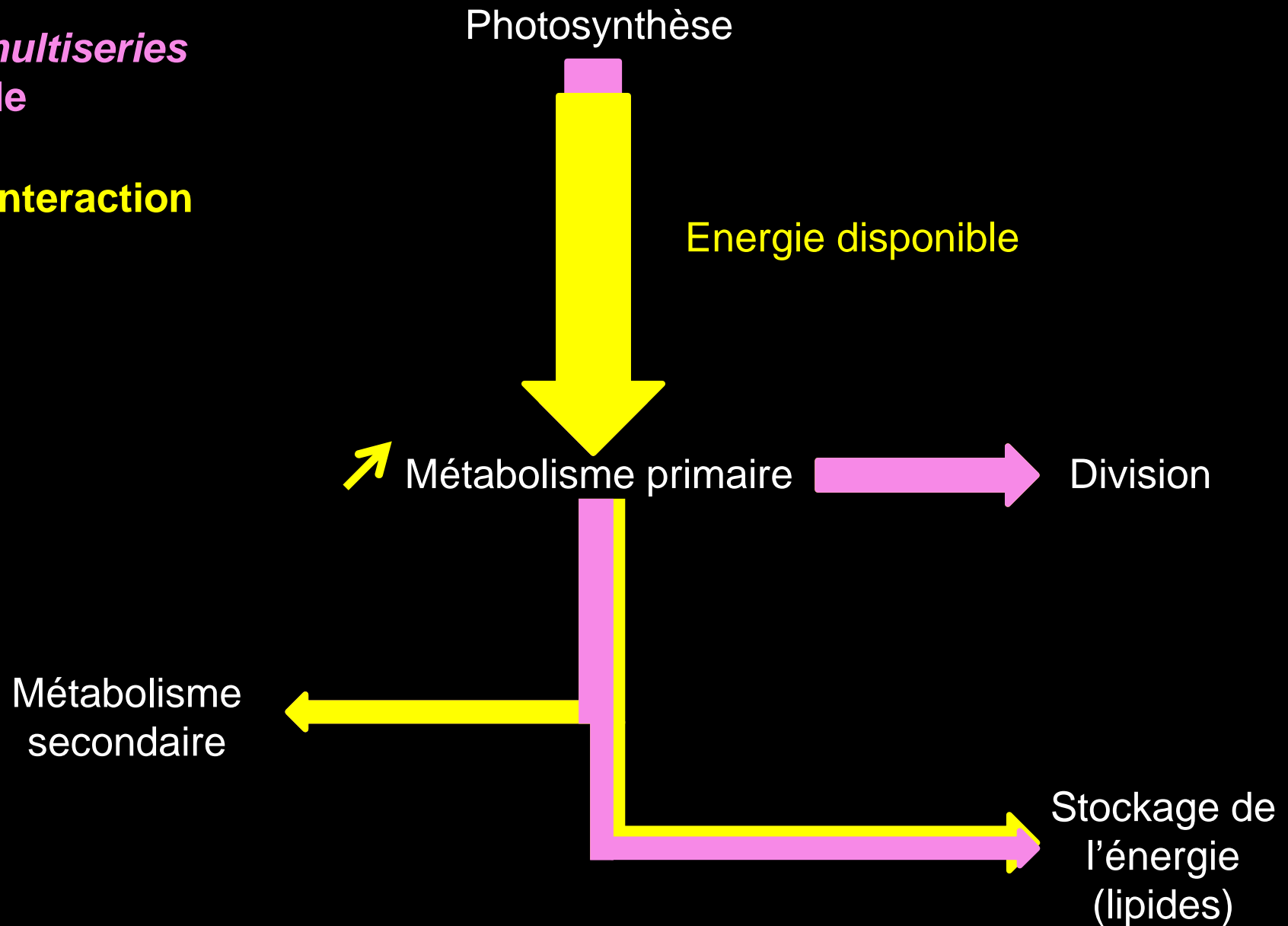
P. multiseriis
seule



3.2. Interaction *Pseudo-nitzschia* - *Chaetoceros neogracile*

P. multiseriis
seule

En interaction



3.3. Interaction *Pseudo-nitzschia* - bactéries



L'absence de bactéries diminue ou stoppe la production d'AD.

La présence de certaines bactéries augmente la production d'AD (Douglas & Bates 1992, Bates et al. 1995).

→ Quelle est l'influence des communautés bactériennes sur la production (ou non) d'AD ?

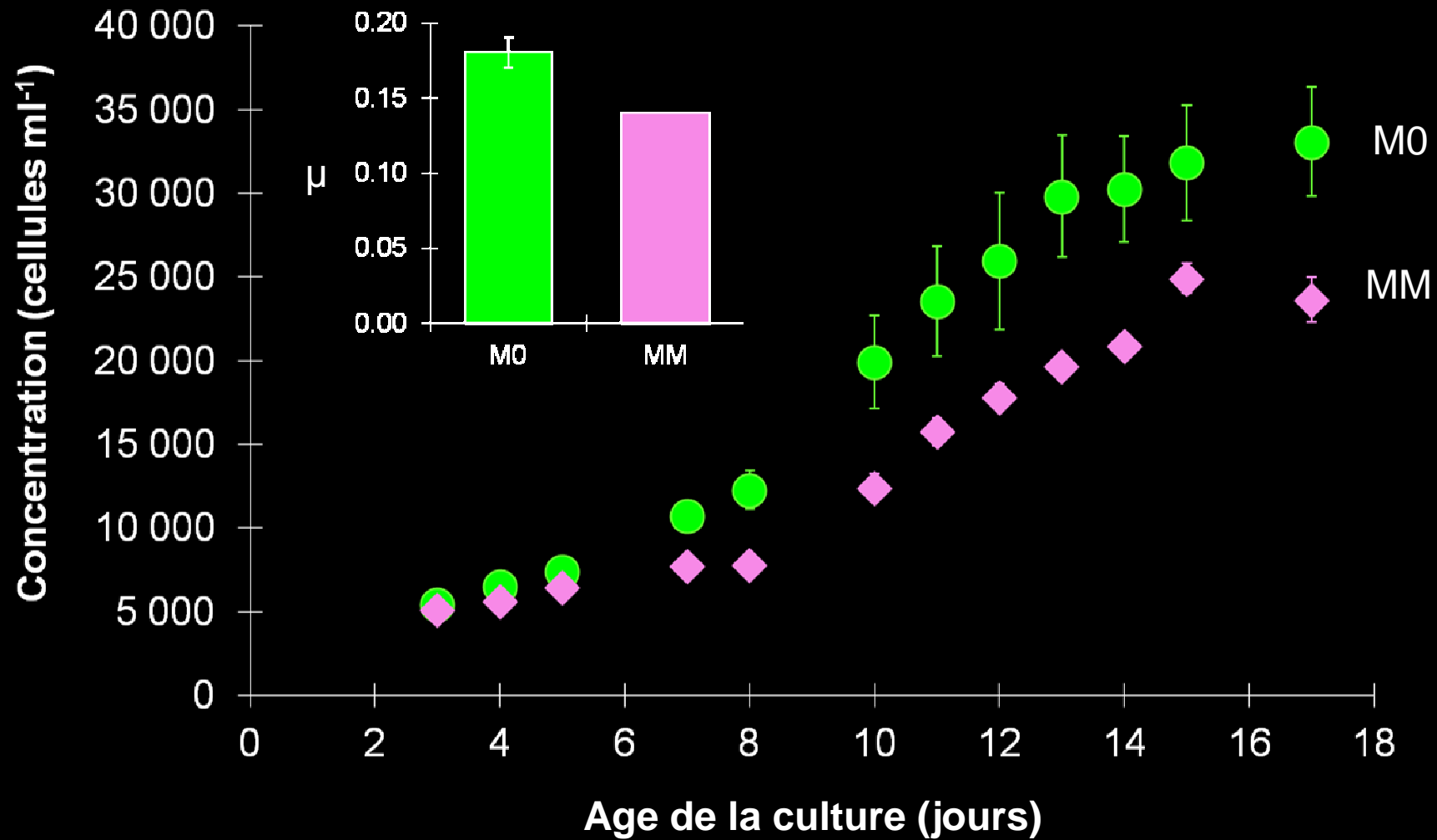
→ La toxicité (ou non toxicité) est-elle liée à la communauté bactérienne associée ?

3.3. Interaction *Pseudo-nitzschia* - bactéries

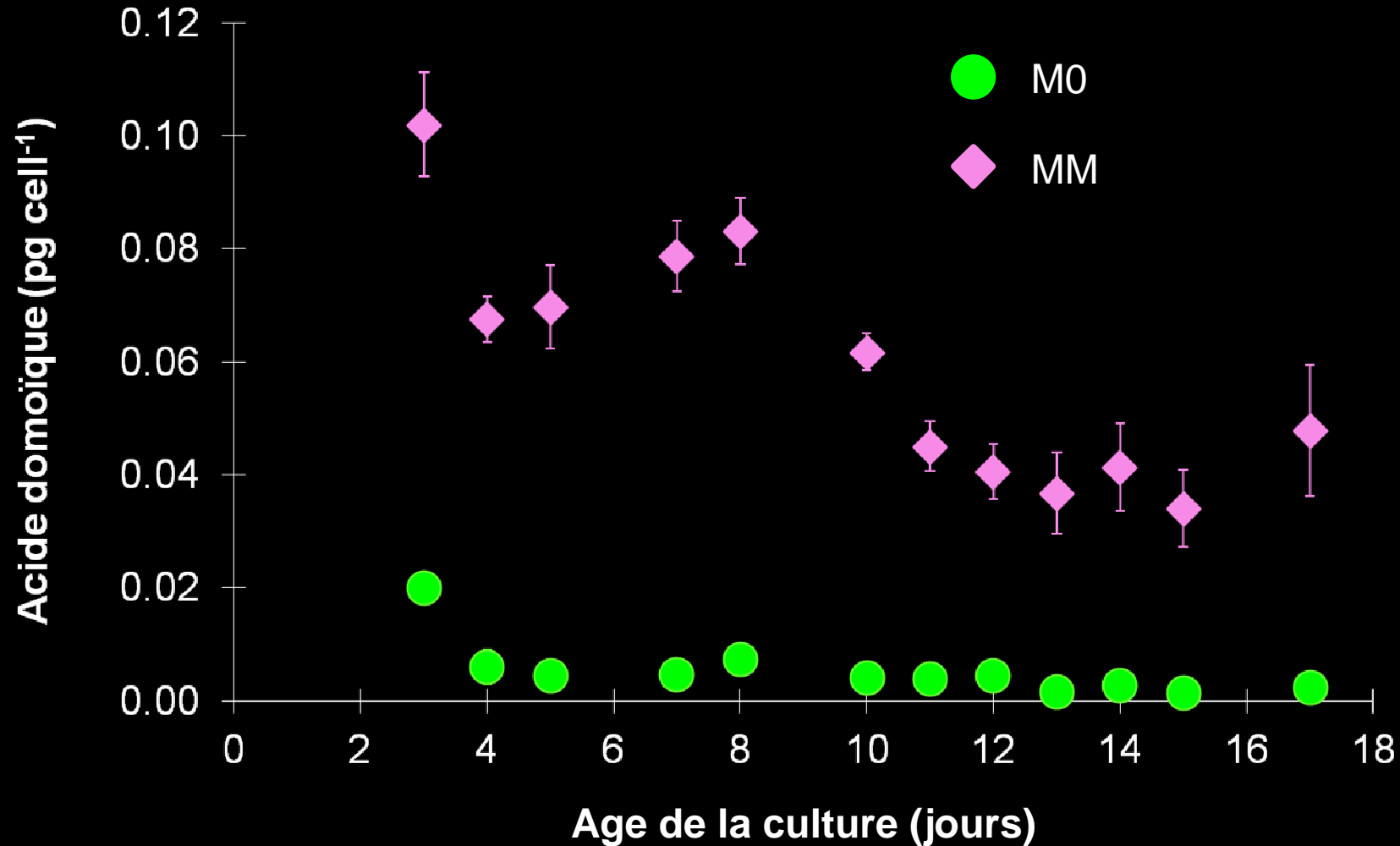
- *P. multiseriis* → quasi-axénique (bactéries en partie éliminées avec des antibiotiques) = M0
- ◆ *P. multiseriis* → avec ses propres bactéries = MM
- ▲ *P. multiseriis* → avec les bactéries de *P. delicatissima* (non-toxique) = MD

3.3. Interaction *Pseudo-nitzschia* - bactéries

Concentration cellulaire



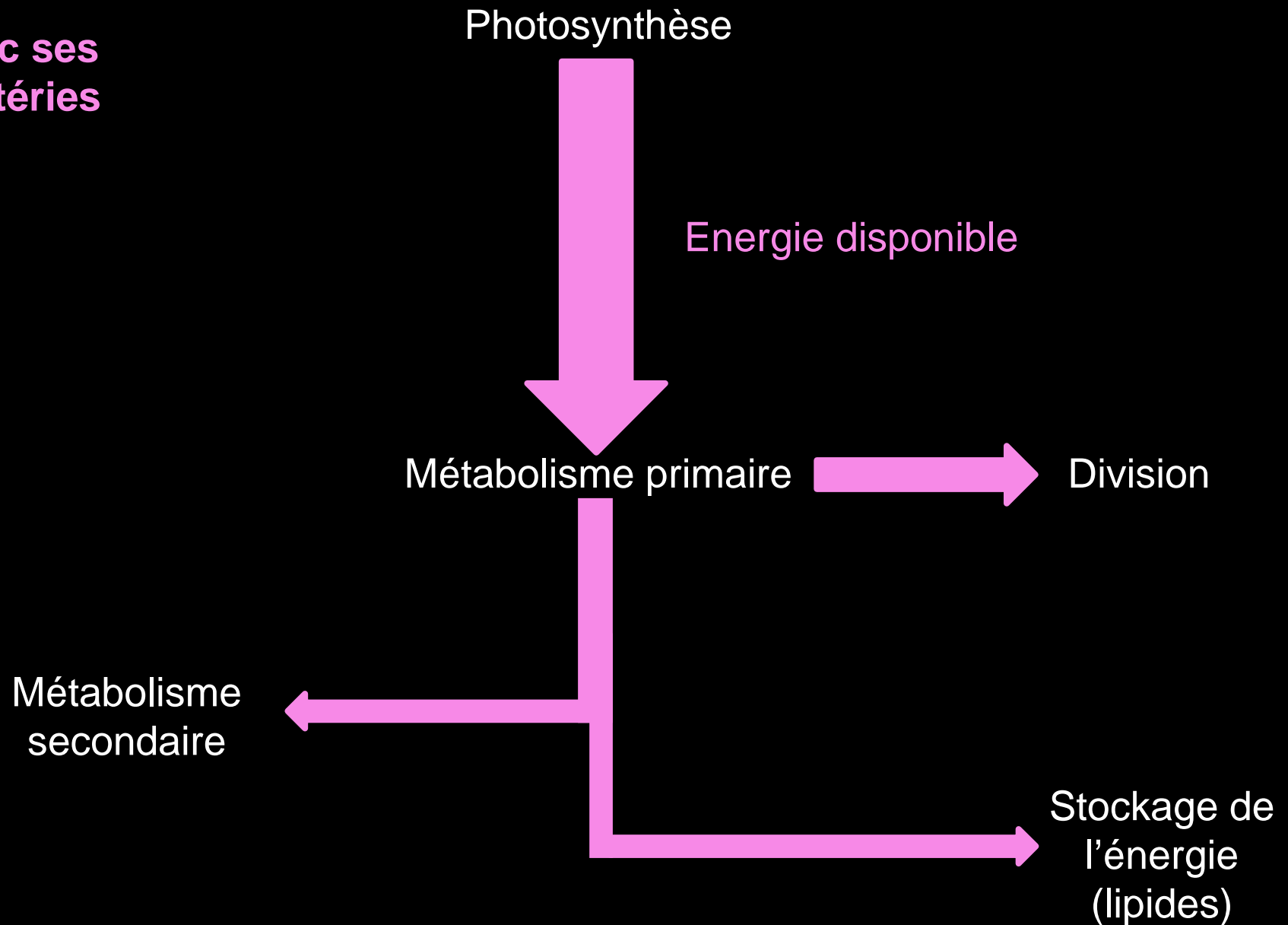
→ - de bactéries = meilleure croissance

3.3. Interaction *Pseudo-nitzschia* - bactéries**Acide domoïque = métabolisme secondaire**

→ - de bactéries = pas/peu de production d'acide domoïque

3.3. Interaction *Pseudo-nitzschia* - bactéries

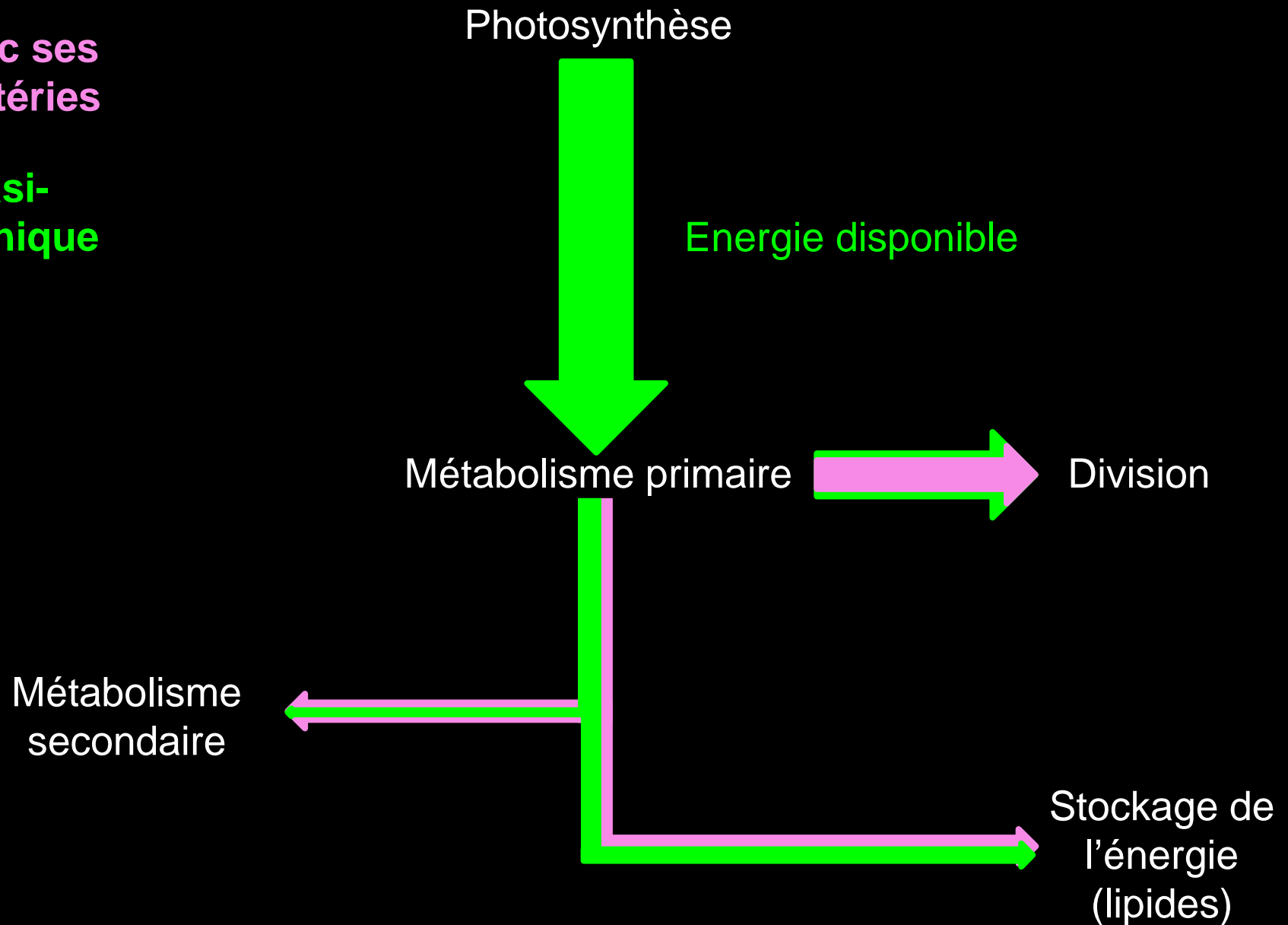
Avec ses
bactéries



3.3. Interaction *Pseudo-nitzschia* - bactéries

Avec ses
bactéries

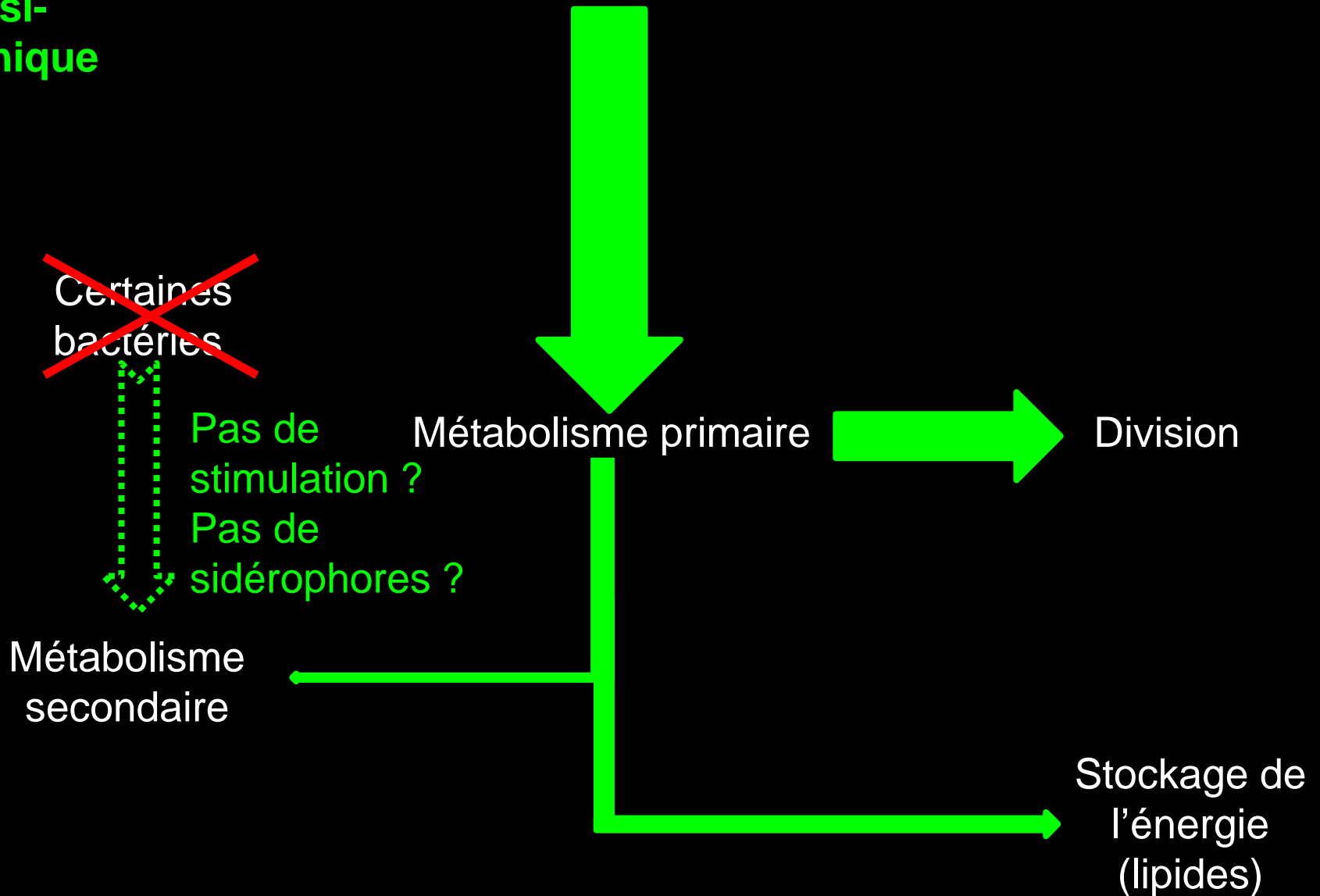
Quasi-
axénique



3.3. Interaction *Pseudo-nitzschia* - bactéries

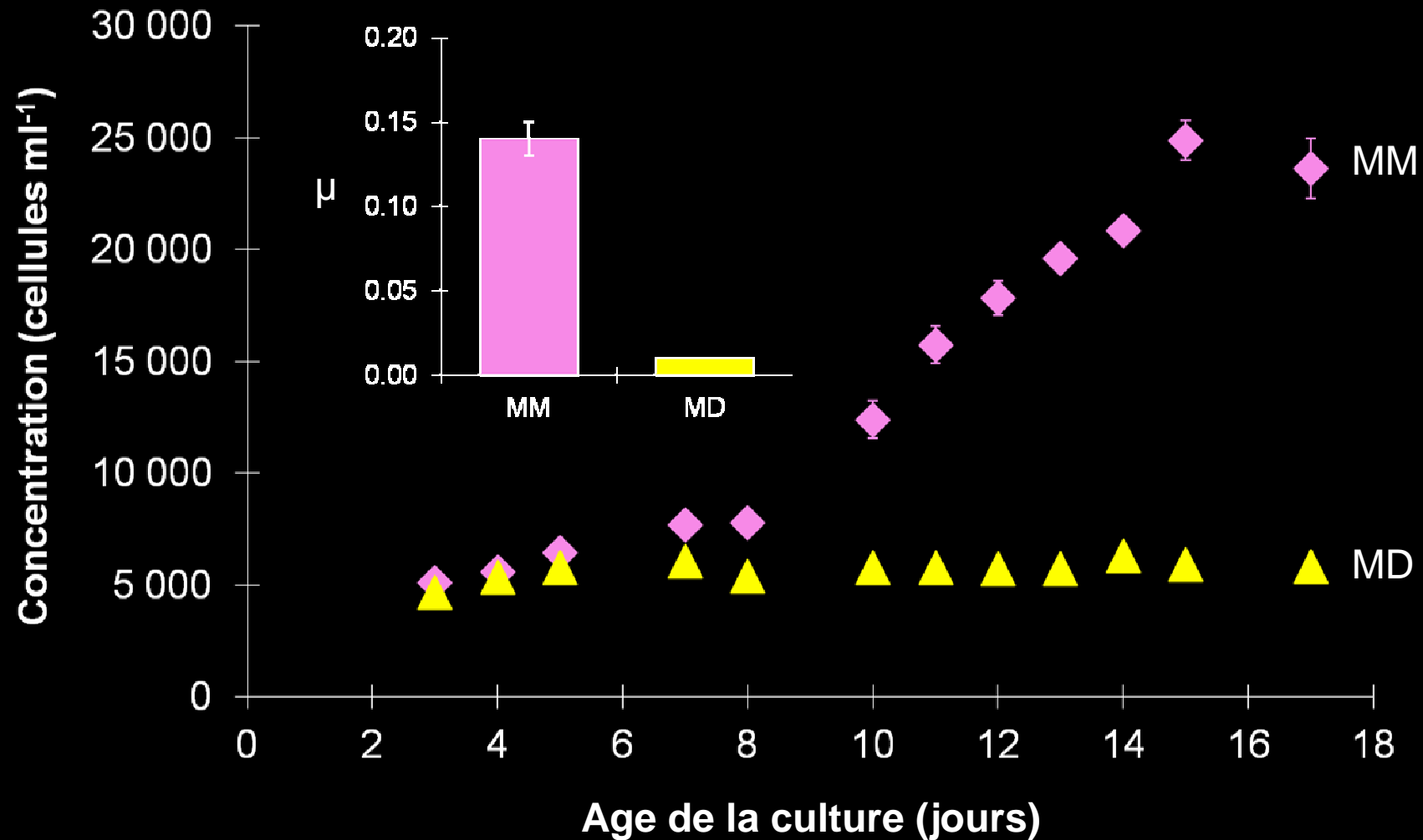
Quasi-axénique

Photosynthèse

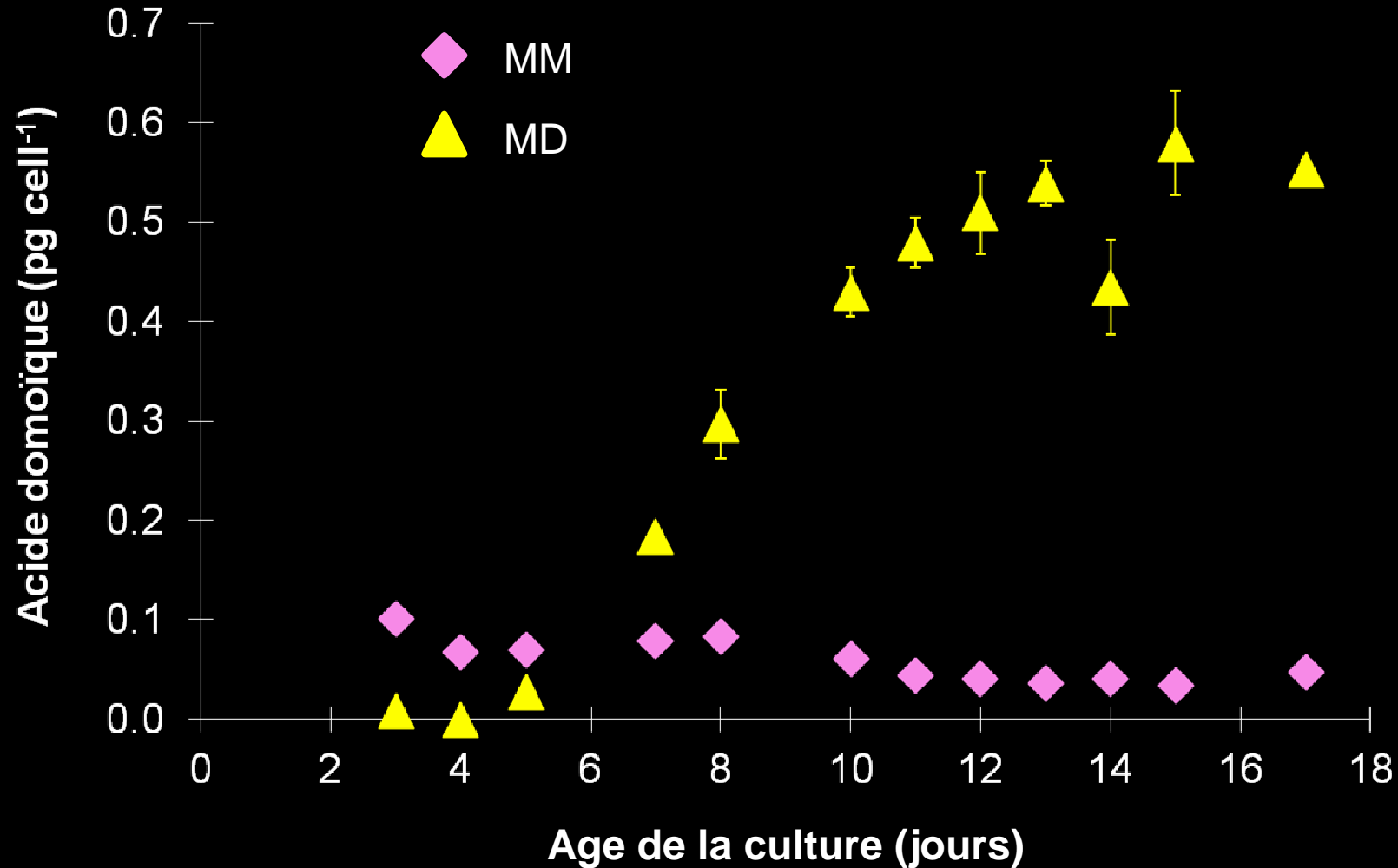


3.3. Interaction *Pseudo-nitzschia* - bactéries

Concentration cellulaire



→ bactéries d'une autre espèce = pas de croissance

3.3. Interaction *Pseudo-nitzschia* - bactéries**Acide domoïque = métabolisme secondaire**

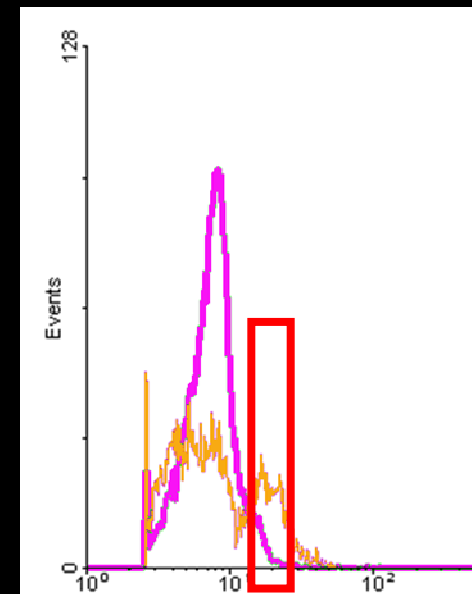
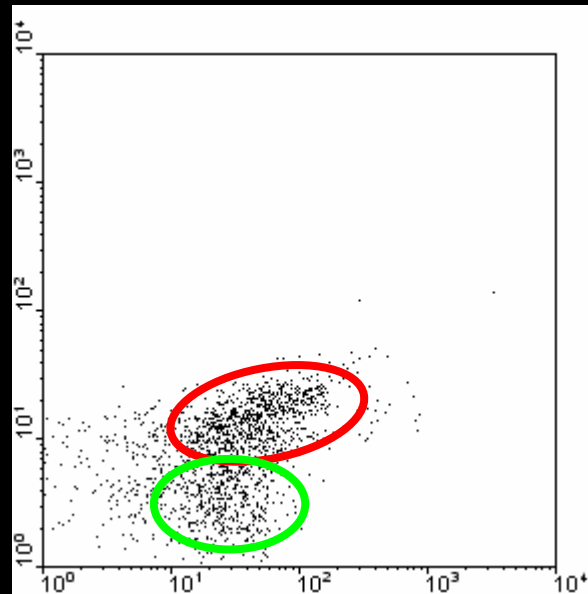
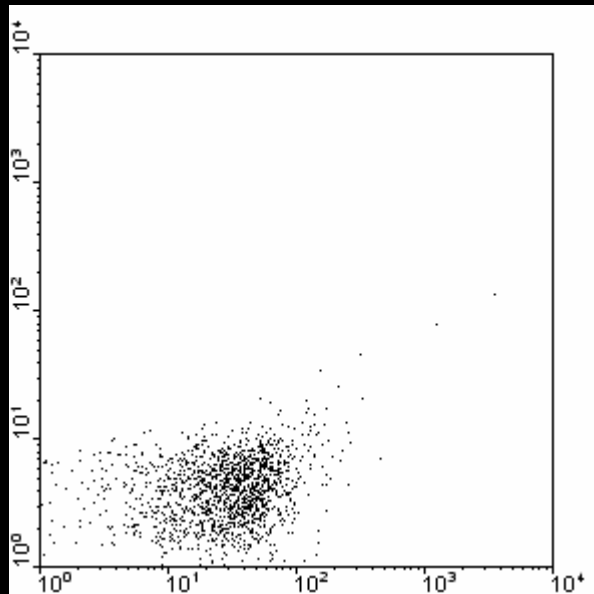
→ bactéries d'une autre espèce = très forte production d'AD (x16)

3.3. Interaction *Pseudo-nitzschia* - bactéries

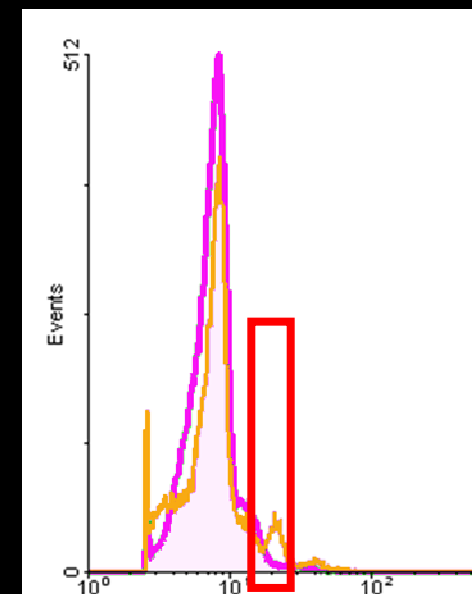
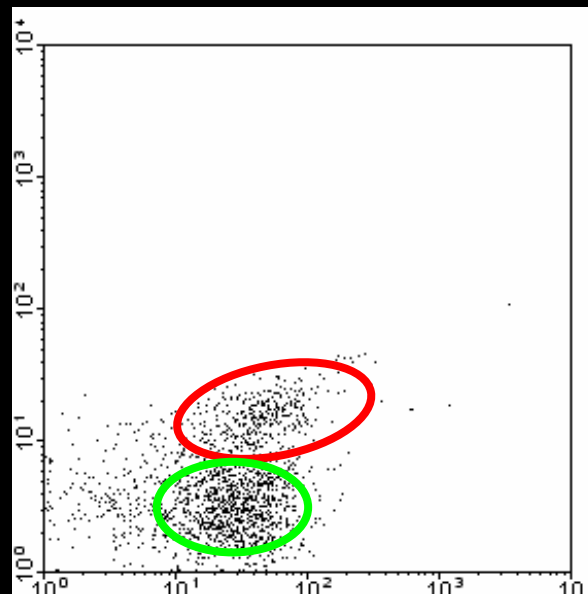
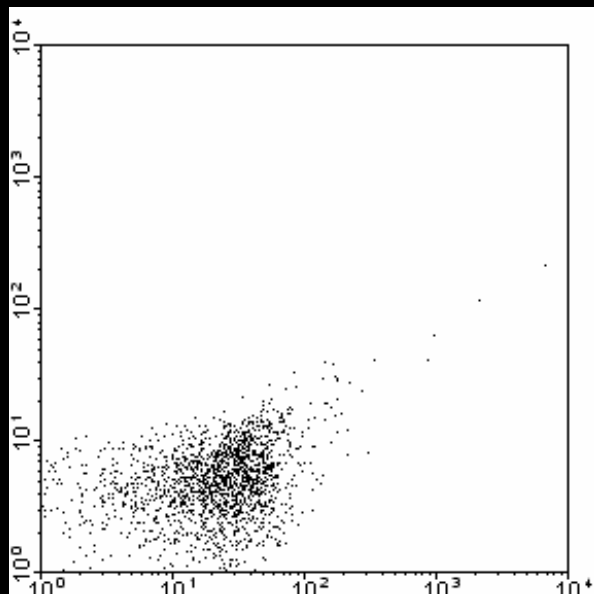
MM

MD

J7
SSC



J15
SSC



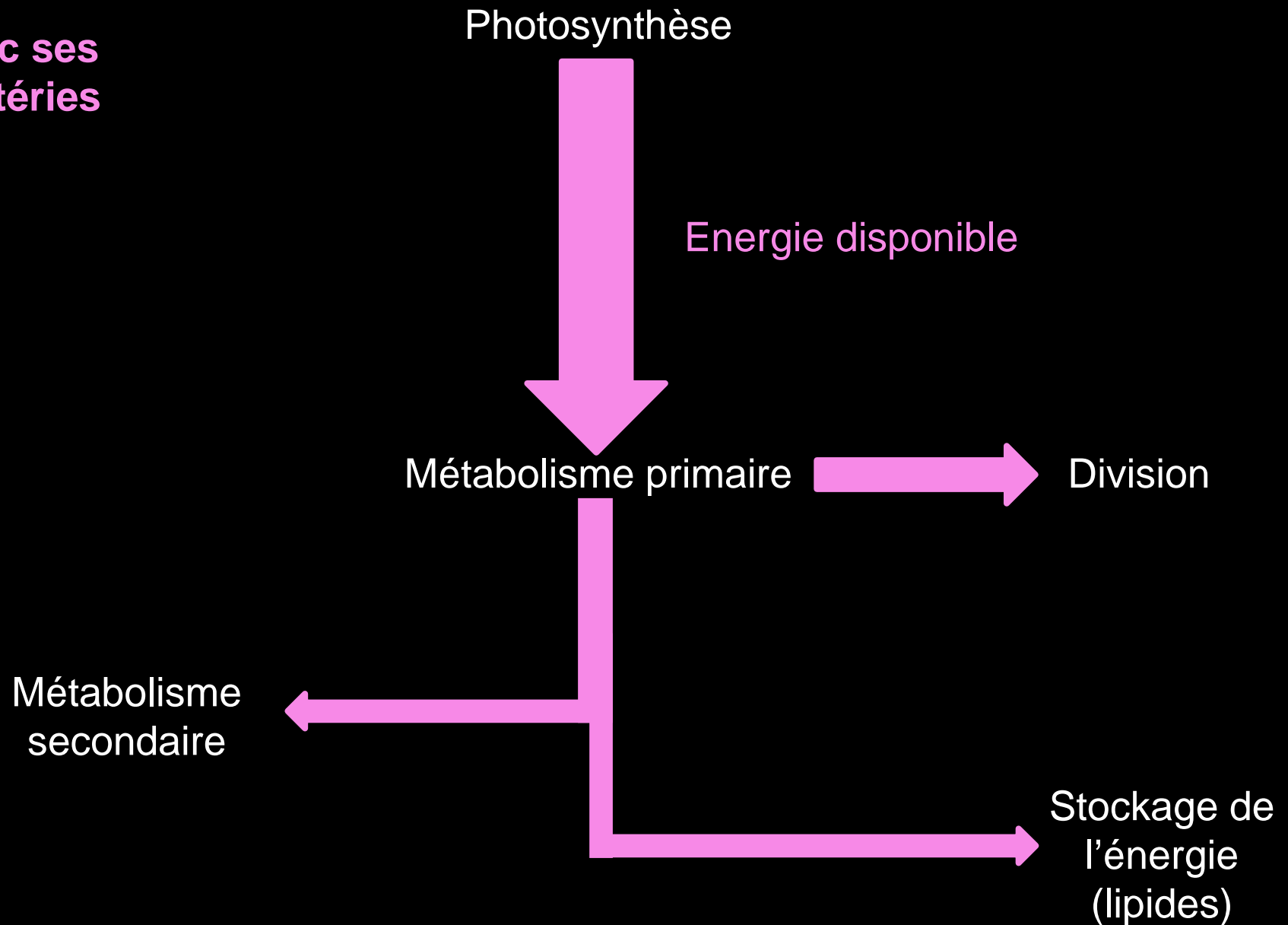
FSC

FSC

FL1 52

3.3. Interaction *Pseudo-nitzschia* - bactéries

Avec ses
bactéries



3.3. Interaction *Pseudo-nitzschia* - bactéries

Avec ses
bactéries

Avec bactéries
d'une autre espèce

Photosynthèse

Energie disponible

Métabolisme primaire

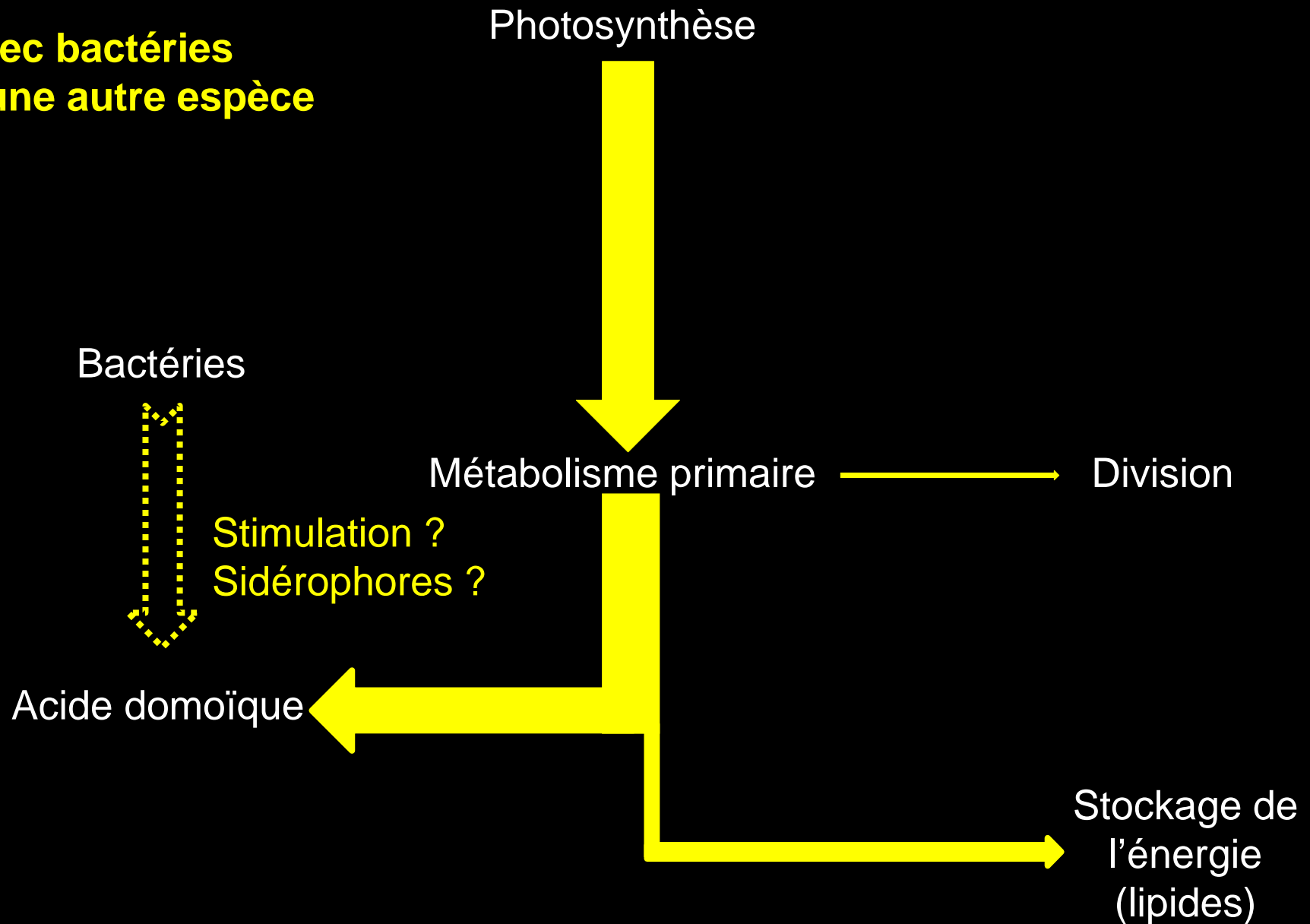
Division

Métabolisme
secondaire

Stockage de
l'énergie
(lipides)

3.3. Interaction *Pseudo-nitzschia* - bactéries

**Avec bactéries
d'une autre espèce**



3.4. Toxicité cuivre

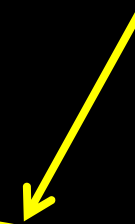


Interaction (avec une diatomée sympatrique)

(Lelong *et al.*, to be submitted, Applied and Environmental Microbiology)

Bactéries

(Lelong *et al.*, to be submitted, Harmful Algae)



Toxicité Cu

(Lelong *et al.*, Aquatic Toxicology 2012)



3.4. Toxicité cuivre



Acide domoïque = chélatant du cuivre.

Maldonado et al. (2002) ont montré que *P. multiseriis* + $\sim 120 \mu\text{g l}^{-1}$ de cuivre = **AD x 20** mais comment la physiologie a-t-elle été modifiée ?

→ L'acide domoïque protège-t-il les cellules des effets toxiques du cuivre ?

3.4. Toxicité cuivre

Contrôle

Photosynthèse

Energie disponible

Métabolisme primaire

Division

Métabolisme
secondaire

Stockage de
l'énergie
(lipides)

3.4. Toxicité cuivre

Contrôle

+ Cu

Photosynthèse

Energie disponible



Métabolisme primaire

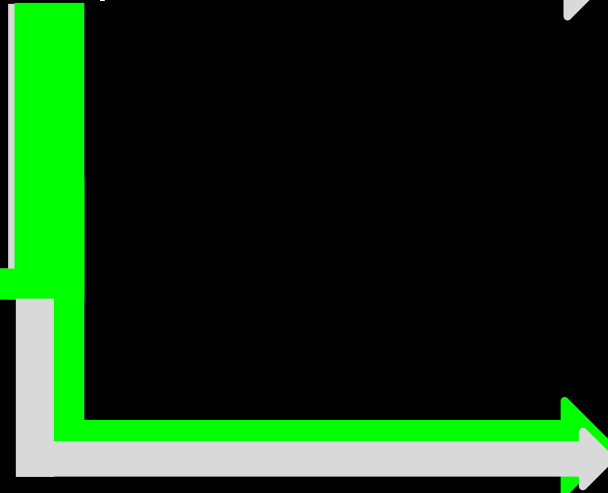


Division

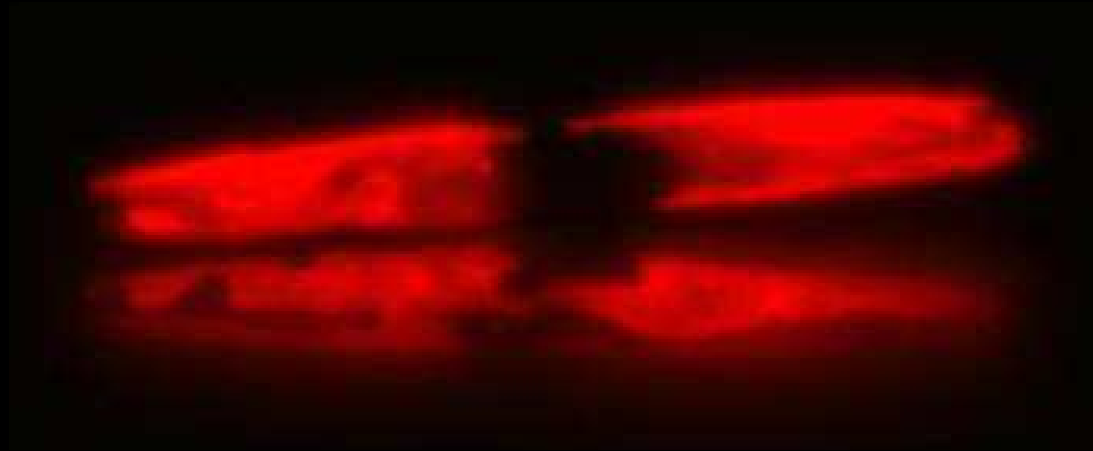
Métabolisme secondaire



Stockage de l'énergie (lipides)



Conclusions et perspectives



4. Conclusions et perspectives

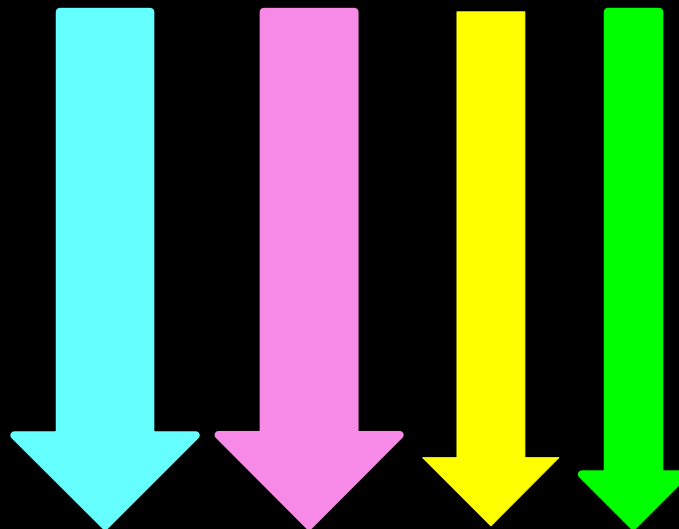
Interaction

- de bactéries

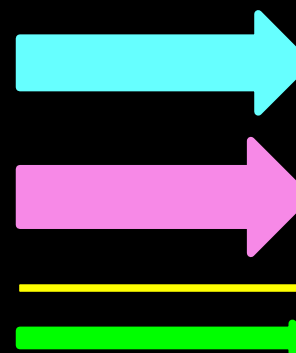
Avec bactéries
d'une autre espèce

+ Cu

Photosynthèse

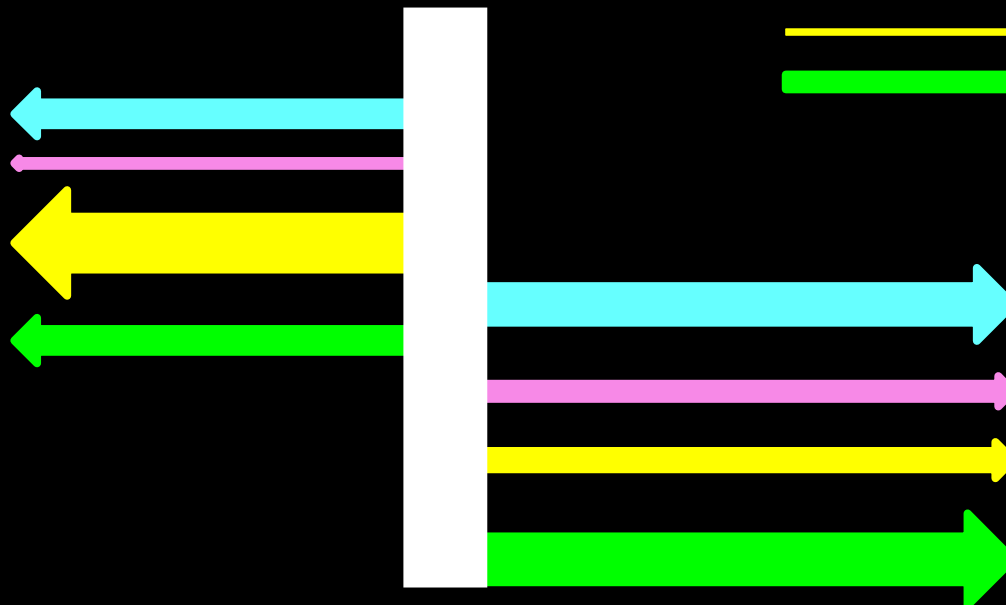


Métabolisme primaire



Division

Acide domoïque

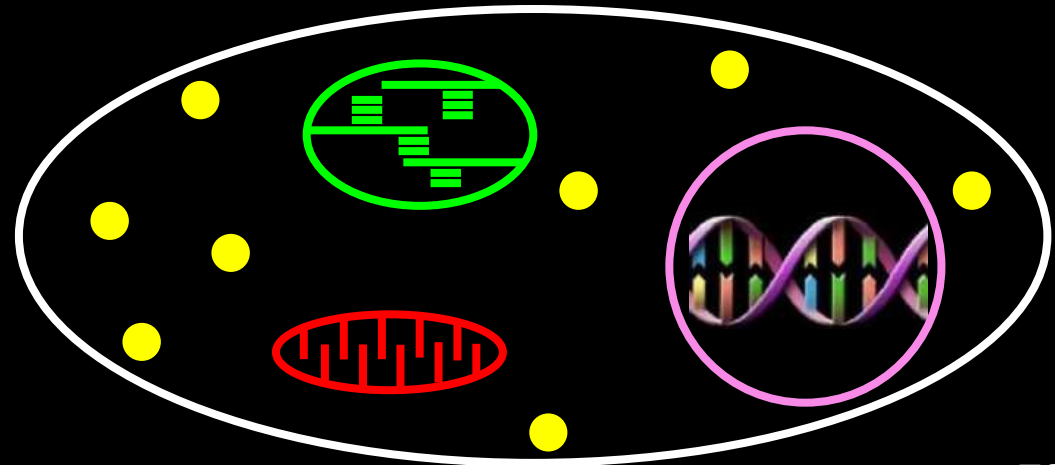


Stockage de
l'énergie
(lipides)

4. Conclusions et perspectives

Améliorer la compréhension des réponses physiologiques :

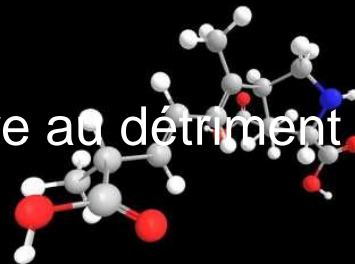
- Photosynthèse,
- Réarrangement des glycolipides des membranes des thylakoïdes,
- Synthèse d'ATP, respiration,
- Cycle cellulaire,
- Stockage d'énergie : polysaccharides,
triglycérides,
- Expression de gènes et protéines (impliqués dans
les réponses physiologiques),
- ...



4. Conclusions et perspectives

→ Quel est le rôle de l'AD ?

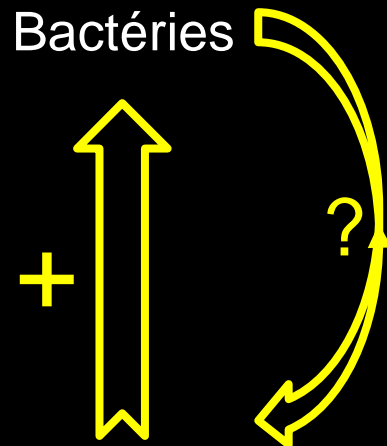
- Reste difficile à appréhender.
- Aucun effet allélopathique (Lundholm et al. 2005), ne protège pas du broutage par le zooplancton (Thessen et al. 2010) et très peu d'effets connus sur les filtreurs.
- Ne confère pas d'avantage lors d'une interaction avec une autre diatomée.
- Ne protège pas d'une toxicité cuivre.
- Pourtant, coup énergétique.
- Sa production semble se faire au détriment de la croissance cellulaire (Thessen et al. 2009, Lelong et al. en prép).



4. Conclusions et perspectives

- Certaines bactéries sont indispensables à la production d'AD.

- En cas de forte induction de la production par des bactéries, la croissance peut être stoppée.



Acide domoïque

- En revanche, l'AD a un effet positif sur la croissance de certaines bactéries.

L'induction par les bactéries de la production d'AD par *Pseudo-nitzschia* peut-elle leur être bénéfique ?

→ **Rôle clé des bactéries dans la production d'AD.**

Toxicité amnésiante dans les coquilles St Jacques des Pertuis charentais en 2010 - 2011

Mireille Ryckaert
Ifremer, La Rochelle

Toxicité amnésiante dans les coquilles St Jacques des pertuis Charentais en 2010-2012

Données scientifiques et aide à la gestion

Laboratoire Environnement et Ressources des Pertuis Charentais



La coquille Saint Jacques dans les pertuis charentais

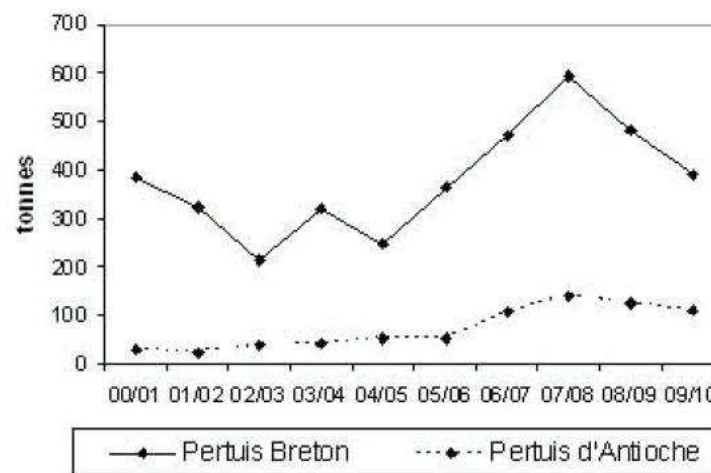
Campagnes annuelles réglementées d'octobre à février.

Une centaine de bateaux, pour des prises de 600 à 700 tonnes par an.

Coquilles coraillées



Capture par campagne (octobre-février)



Données Ifremer/HGS

LE CONTEXTE

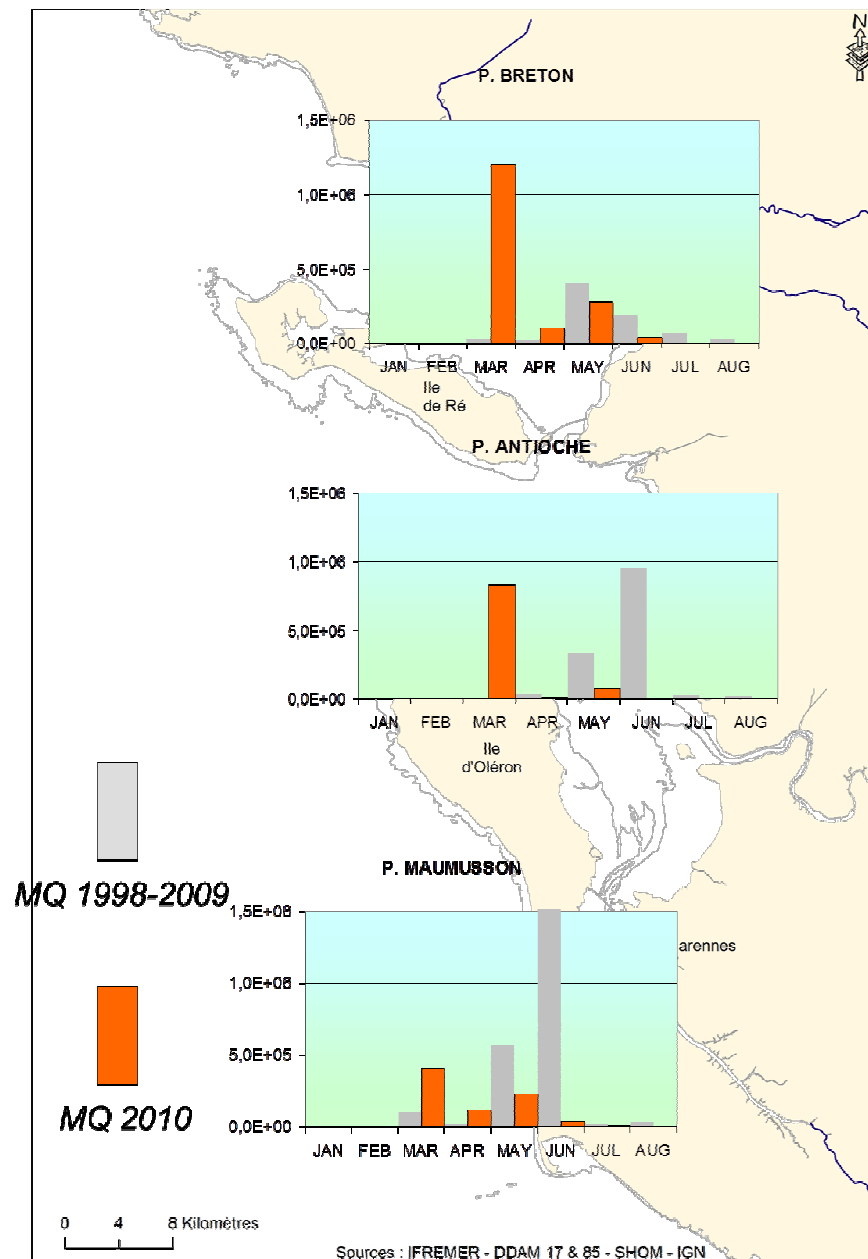
Contamination en deux temps par *Pseudo-nitzschia australis* :

- principale à partir du 15 mars 2010 (deux semaines après la tempête Xynthia) pendant deux semaines,

- puis secondaire en avril mai 2010

Contamination et décontamination rapide des moules et des huîtres

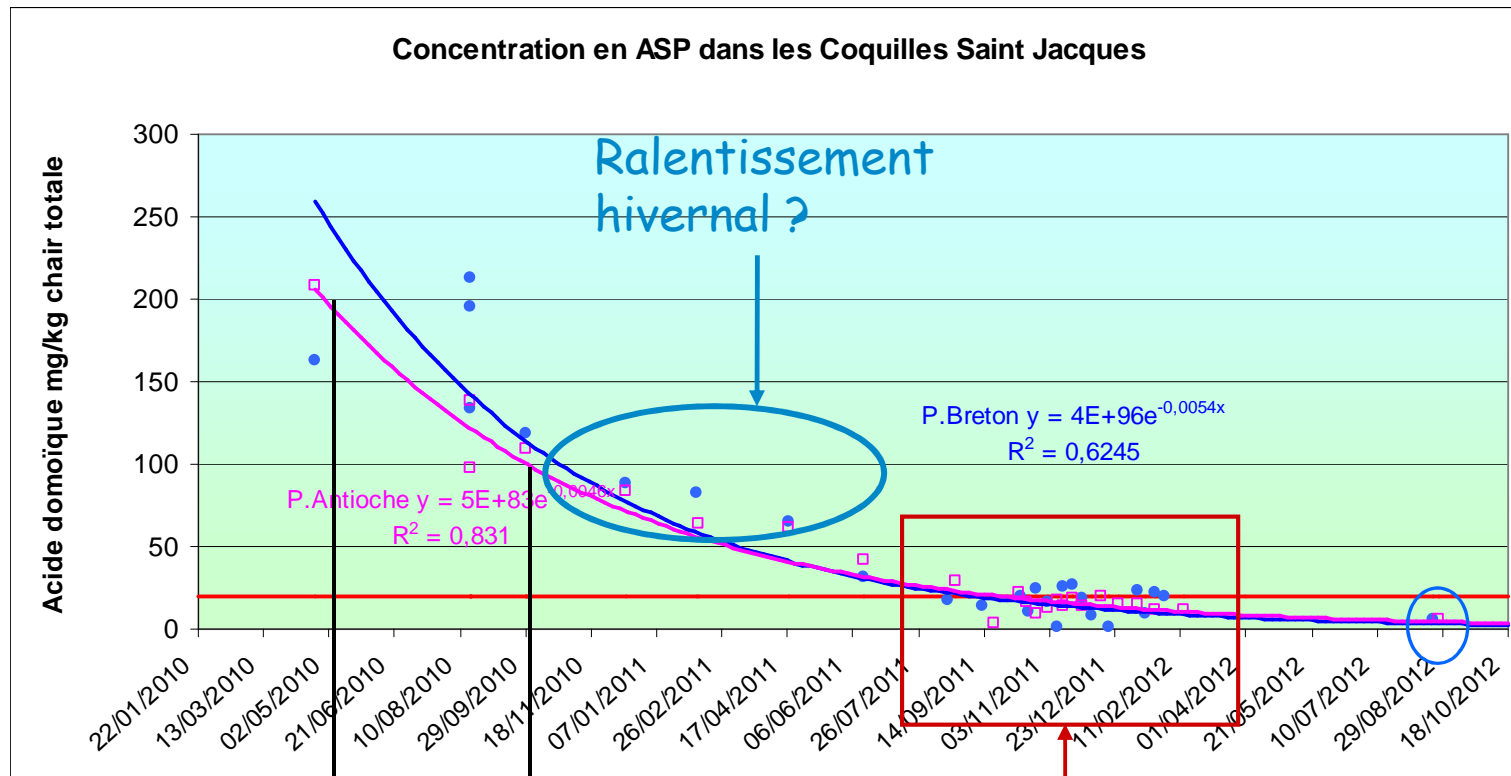
Pas de dépassement des seuils d'alerte en 2011 et 2012



Présence de *Pseudo-nitzschia* spp dans les Pertuis Charentais.
Max. mensuels (MQ) 2010 comparés aux max. mensuels 1998-2009

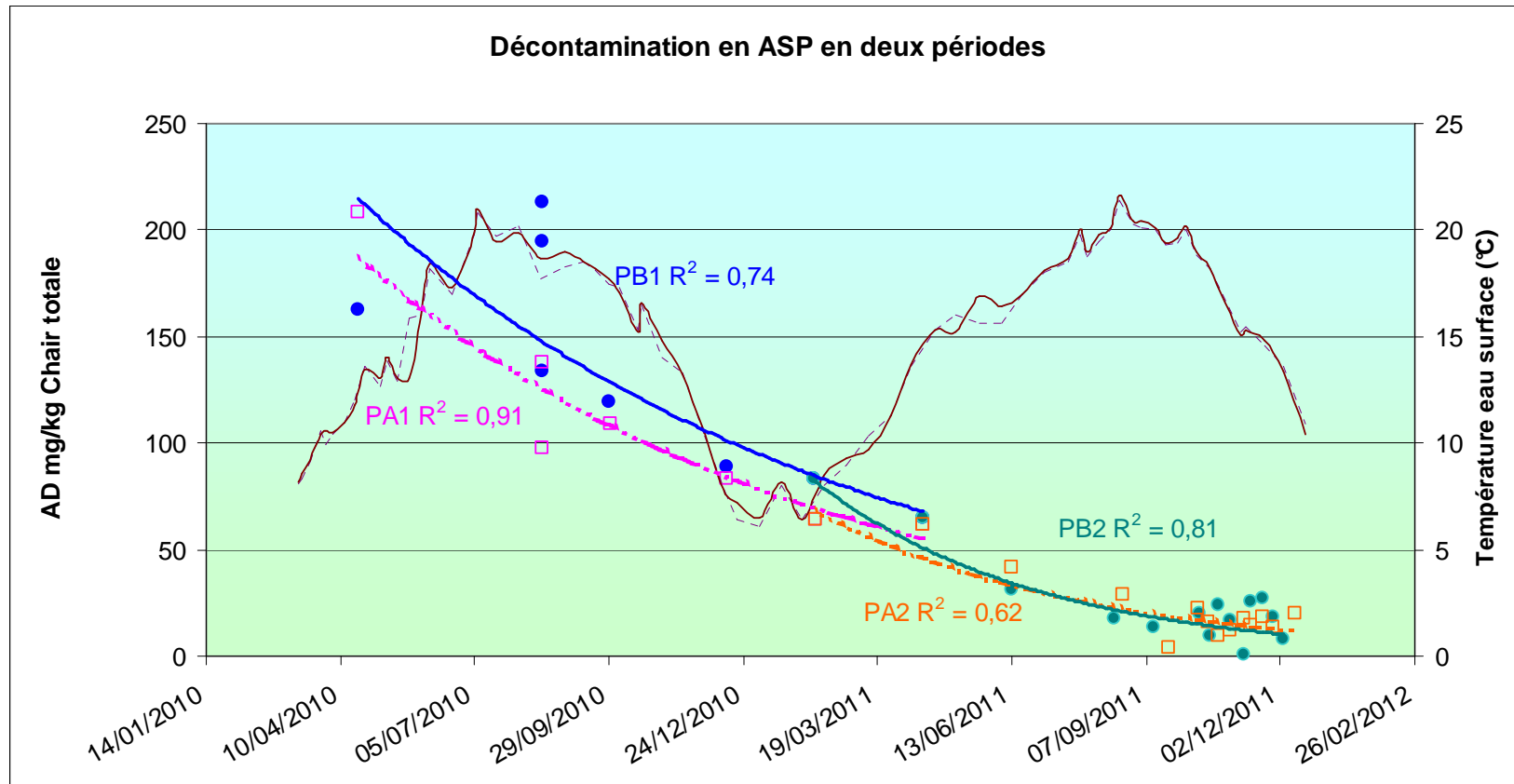
Journées REPHY 26-27 septembre 2012 NANTES

Décontamination (naturelle)



$\frac{1}{2}$ vie environ 150 jours

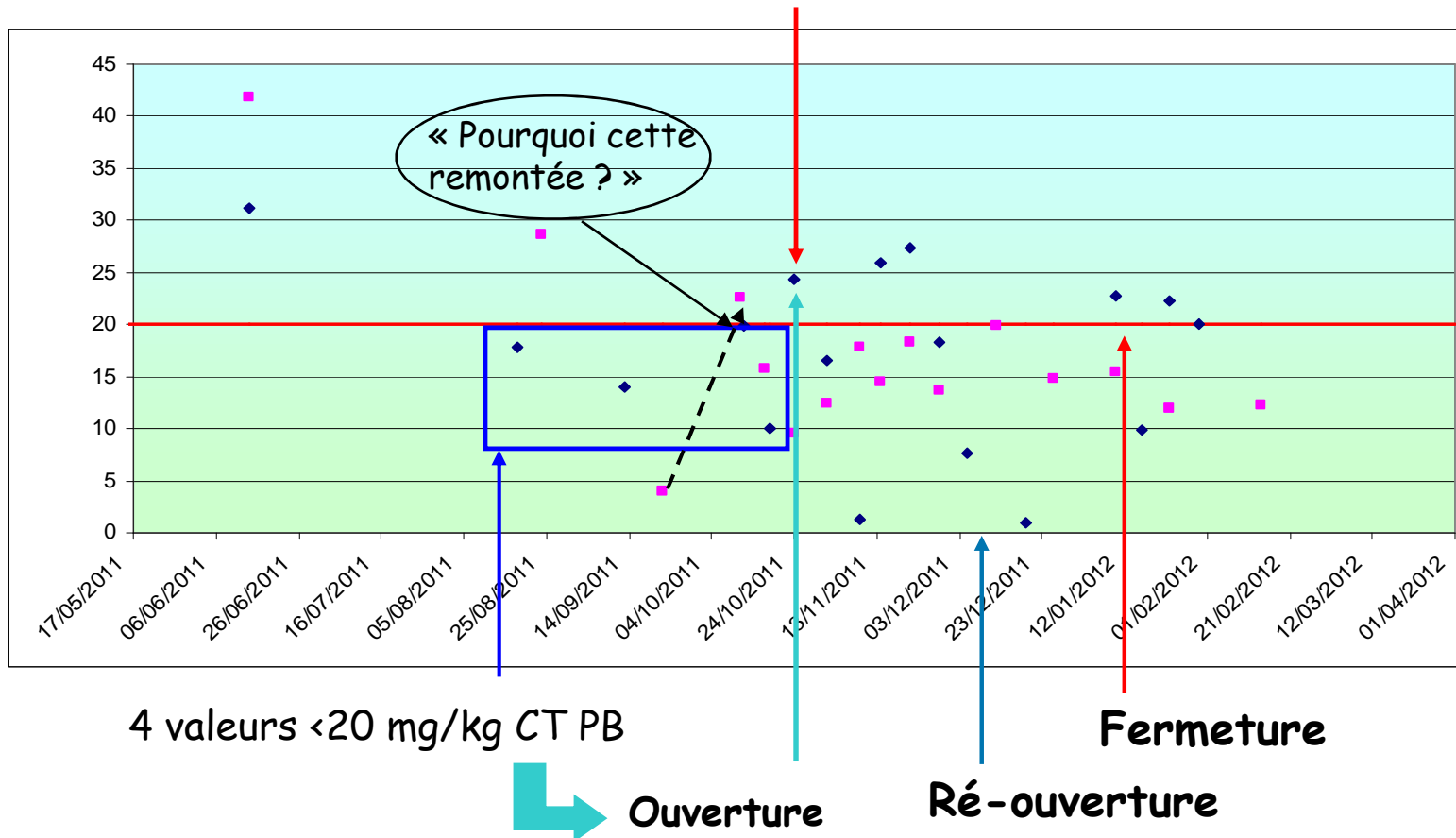
Ralentissement hivernal ?



La crise : confrontation données/gestion

Résultat ASP 2h après l'ouverture de la pêche

CSJ rejetées à la mer et fermeture



LES QUESTIONS

Celles auxquelles on a pu répondre (+ ou -) :

- La durée probable de la contamination
- Le rôle improbable des sédiments dans le stockage de la toxines et, par conséquent, l'absence d'impact d'une remise en suspension sur une nouvelle contamination éventuelle.

Celles auxquelles il est difficile de répondre :

- La variabilité géographique de la contamination
- Les raisons de la plus lente décontamination des coquilles St Jacques comparées aux autres pectinidés
- La possibilité de forcer la décontamination des CSJ

Celles dont la réponse nous aiderait bien :

- Que valent les analyses à une semaine d'intervalle pour évaluer une décontamination ASP proche du seuil ?
- Peut-on calculer une marge d'incertitude sur les résultats et la communiquer aux décideurs pour l'appréciation des risques ?

Les enseignements des crises

Une des missions de l'Ifremer est apporter, en les expliquant de manière **pédagogique**, les éléments scientifiques et techniques aux partenaires locaux comme aide à la gestion.

Les crises contribuent à faire émerger de nombreuses questions, parfois sous forme de demandes d'avis en complément des réseaux et dans l'urgence, d'où nécessité sinon d'avoir des **experts** locaux, du moins de s'appuyer sur un panel de spécialistes

Parmi les questions posées certaines contribuent à faire émerger de nouvelles problématiques et à orienter les **futurs programmes de recherche**, ce qui implique d'être à l'écoute des propositions et suggestions de nos partenaires.



MERCI DE VOTRE ATTENTION



Ostreopsis en Méditerranée: enjeux, répartition
géographique du stock macro-algal,
vers une surveillance spécifique?

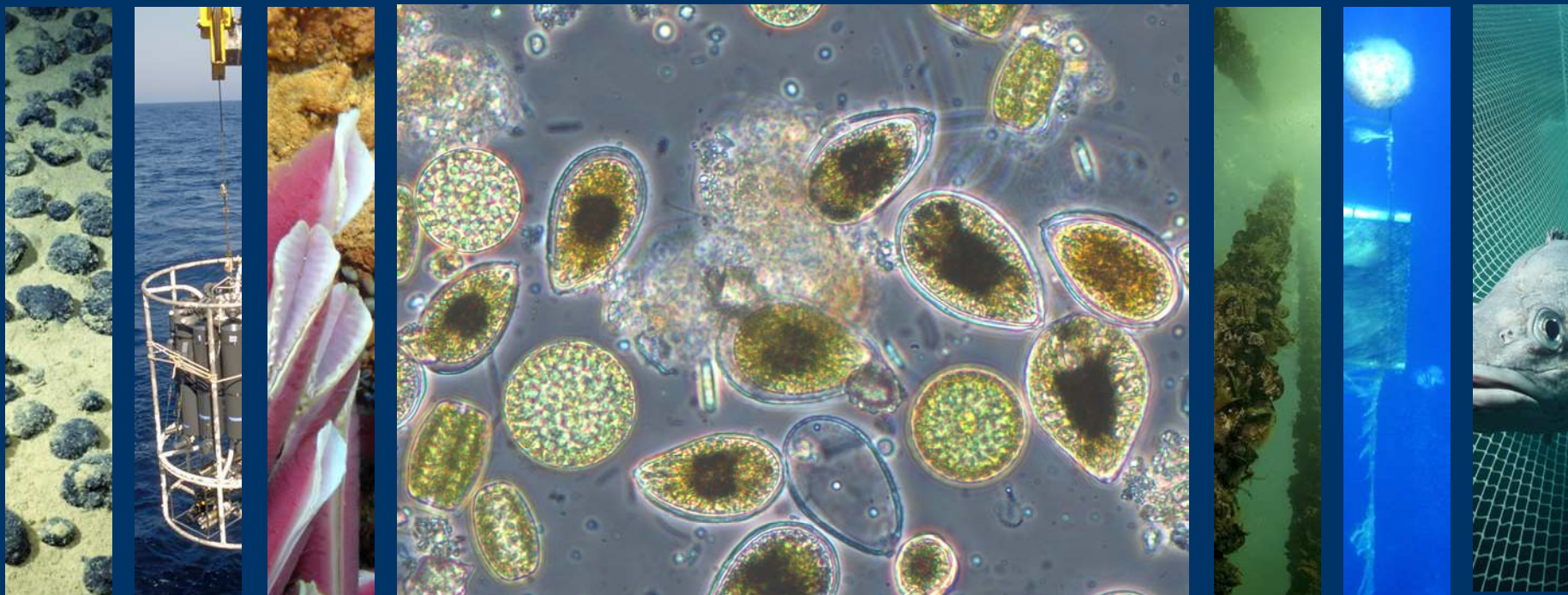
Hubert Grossel
Ifremer, Toulon

Ostreopsis en Méditerranée

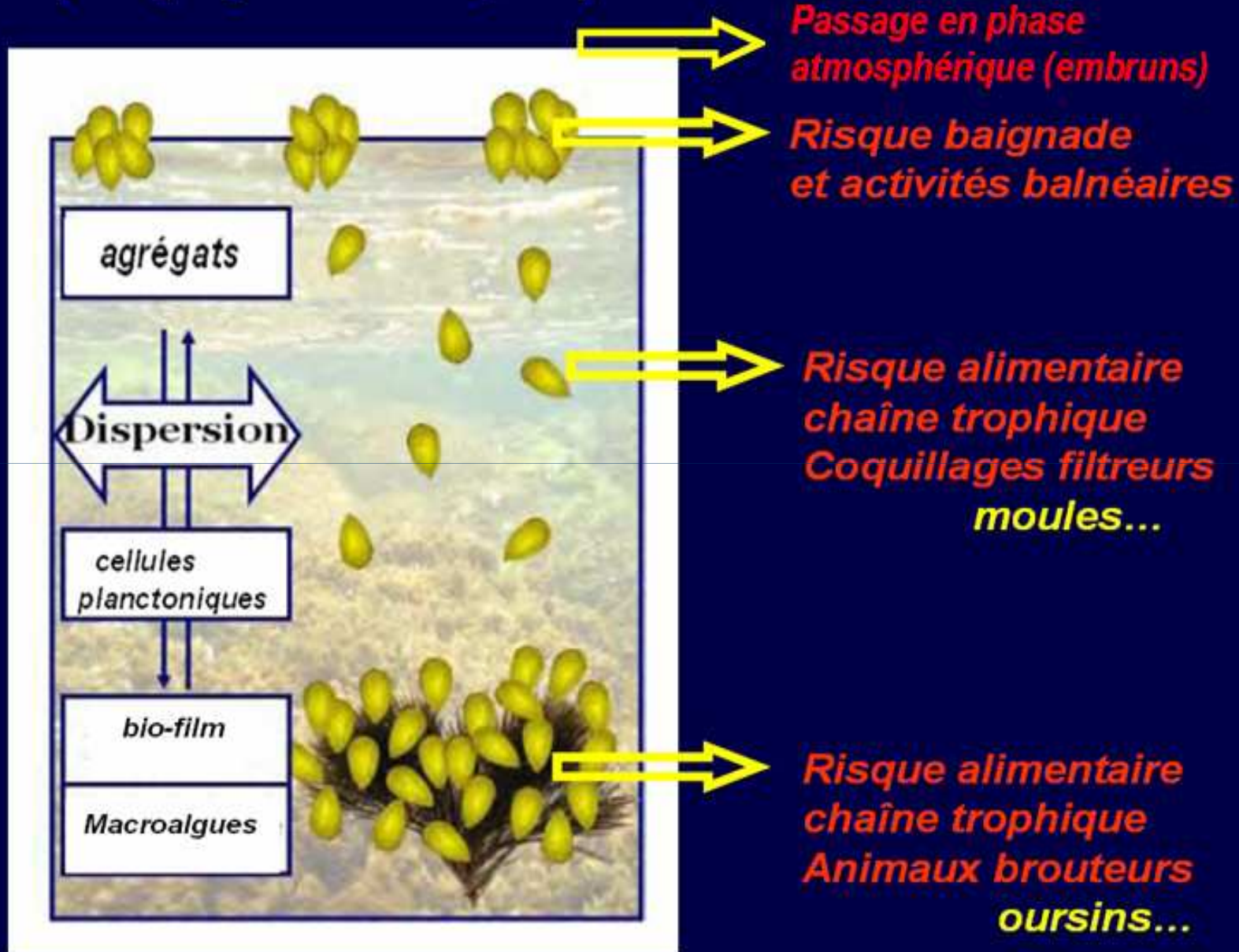
*enjeux, répartition géographique du stock macroalgal
vers une surveillance spécifique?*

Journées REPHY / Nantes 27 septembre 2012

Hubert Grossel LER-PAC / Toulon



Risque phycotoxinique par micro-algue épibenthique



Rappel des principales caractéristiques environnementales favorables à l'*Ostreopsis*

- **Dominance du faciès rocheux, peu profond (de 0 m à \approx -5 m),**
- **Sites plutôt calmes,**
- **Couverture macroalgale significative
(algues brunes – rouges)**
- **Importance du facteur climatique thermique**

Diversité des enjeux et des usages: diversité des compétences



**Nécessité de réseaux
de surveillance spécifiques**

Direction Générale de la Santé (DGS)

- baignade
- fréquentation du littoral (risque aérosols)
- pêche de loisir

Direction Générale de l'Alimentation (DGAL)

- Produits de la pêche professionnelle et de l'aquaculture



Ministère de la Santé et des Sports

Direction générale de la Santé
Sous-direction de la prévention des risques
liés à l'environnement et à l'alimentation
Bureau de l'alimentation et de la nutrition
Bureau de la qualité des eaux

Personne chargée du dossier :
Anne PILLEBOUT
Tél. 01.40.56.57.35
anne.pillebout@sante.gouv.fr

La Ministre de la Santé et des Sports

à

Mesdames et Messieurs les préfets
des Alpes-Maritimes, de l'Aude, des
Bouches du Rhône, de Corse du Sud, de
Haute-Corse, du Gard, de l'Hérault, des
Pyrénées-Orientales, du Var
Madame et Messieurs les Directeurs
généraux des Agences régionales de
santé de Provence Alpes Côtes d'Azur,
Languedoc-Roussillon et Corse

NOTE DE SERVICE N°DGS/EA3/EA4/2010/238 du 30 juin 2010 relative à la surveillance sanitaire et environnementale et aux modalités de gestion des risques sanitaires pour la saison balnéaire 2010, liés à la présence de la microalgue toxique *Ostreopsis spp.* dans les eaux de baignade en méditerranée et à la contamination par ses toxiques des produits de la mer issus de la pêche de loisir.

Validée par le CNP le 25 juin 2010
Visa CNP 2010-119

Date d'application : immédiate
NOR : SASP1017321N

Résumé :

La présente note de service définit les modalités de surveillance sanitaire et environnementale et les modalités de gestion, à mettre en œuvre par les agences régionales de santé et les collectivités du pourtour méditerranéen français pendant la saison balnéaire 2010 pour prévenir l'apparition de cas humains liés à la présence de la microalgue toxique *Ostreopsis spp.* dans les eaux de baignade. Elle définit également les mesures de gestion des risques sanitaires liés à la consommation de produits de la mer issus de la pêche de loisir en Méditerranée et susceptibles d'être contaminés par les toxines d'*Ostreopsis spp.*

Ainsi, compte tenu des résultats de l'AFSSA (cf. supra), en l'état actuel des connaissances et afin de prévenir les risques d'intoxication alimentaire liée à la consommation de produits de la mer, issus de la pêche de loisir sur le pourtour méditerranéen français, susceptibles d'être contaminés par les toxines d'*Ostreopsis spp.*, du 15 juin au 15 septembre, les mesures de gestion sont les suivantes :

- recommandation de consommer les poissons issus de la pêche de loisir après éviscération,
- rappel des interdictions préfectorales de la pêche aux oursins sur une période incluant la saison estivale (dates d'interdiction pouvant varier selon la zone, généralement du 1^{er} mai au 31 octobre) sur tout le littoral méditerranéen, destinées à assurer le renouvellement de l'espèce,
- recommandation de ne pas consommer les autres produits de la mer issus de la pêche de loisir.

Ces mesures seront revues chaque année, au fur et à mesure de l'acquisition des connaissances.

Au cas par cas, il appartient au préfet de prendre des mesures plus restrictives (interdiction) s'il le juge nécessaire.

Il est rappelé que les produits de la mer issus de la pêche professionnelle font l'objet d'un suivi dans le cadre du REPHY (réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines) mis en œuvre par l'IFREMER.

... la DGS a confié en 2009 à l'AFSSA une étude ayant pour objectif d'identifier et de quantifier les palytoxines présentes dans les produits de la mer prélevés en France métropolitaine suite au développement d'*Ostreopsis spp.*

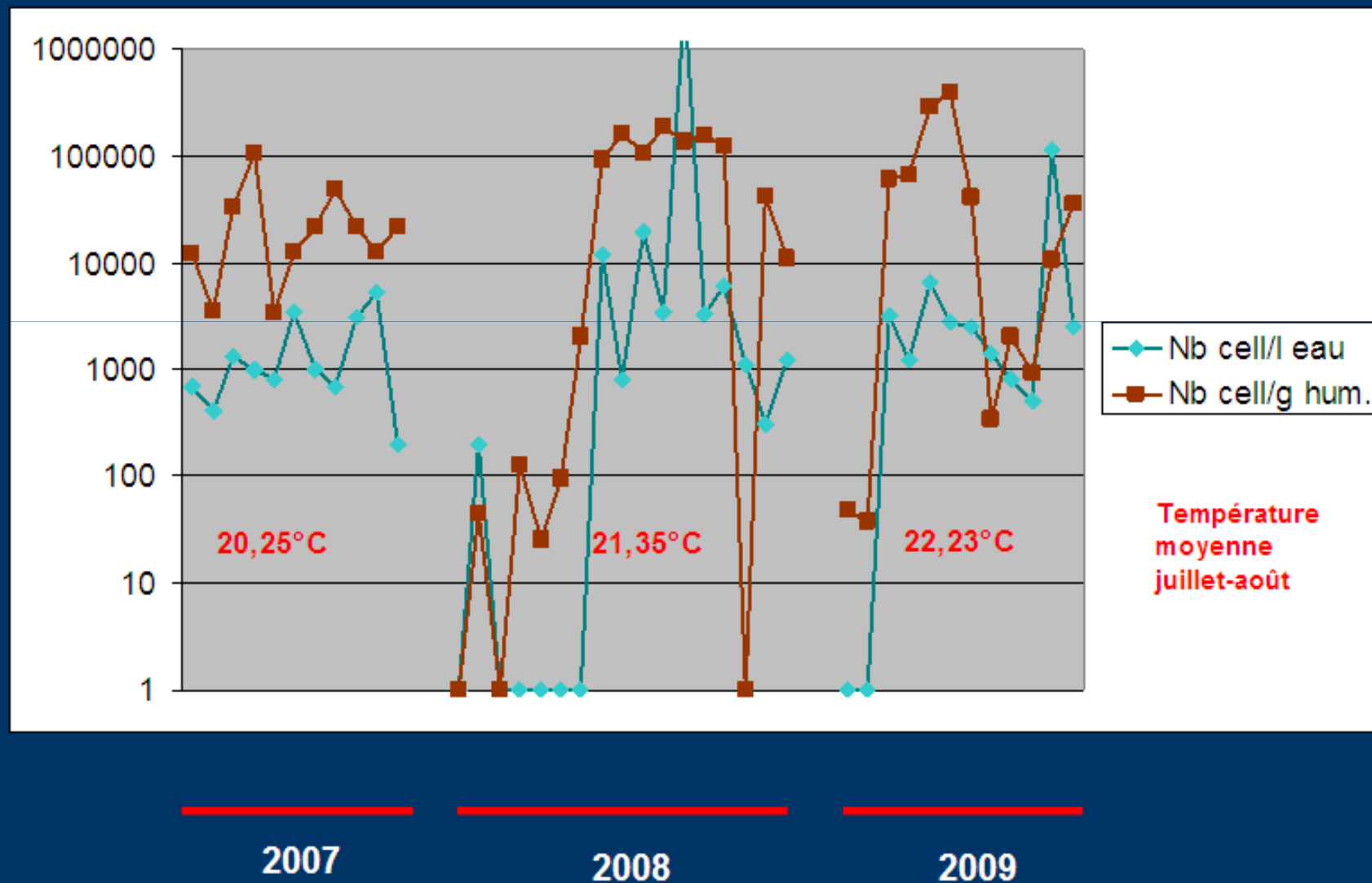
Ce projet s'est intéressé aux produits de la pêche amateur, en étroite collaboration avec l'Ifremer, le Laboratoire d'Océanographie de Villefranche et l'Agence pour la Recherche et la Valorisation Marine.

Résultats:

- chair de poissons et les gonades d'oursins ne semblent pas être contaminées
- viscères de poissons et d'oursins : matrices les plus contaminées
- la toxine est également présente dans des crustacés et des mollusques, comme les céphalopodes

Le profil toxinique des échantillons analysés est quasiment exclusivement composé d'ovatoxine-a.

En 2009, étude Ifremer / DGAL sur la contamination de la chaîne alimentaire dans la poursuite des études mises en place sur le site du Frioul (anse de Morgiret).

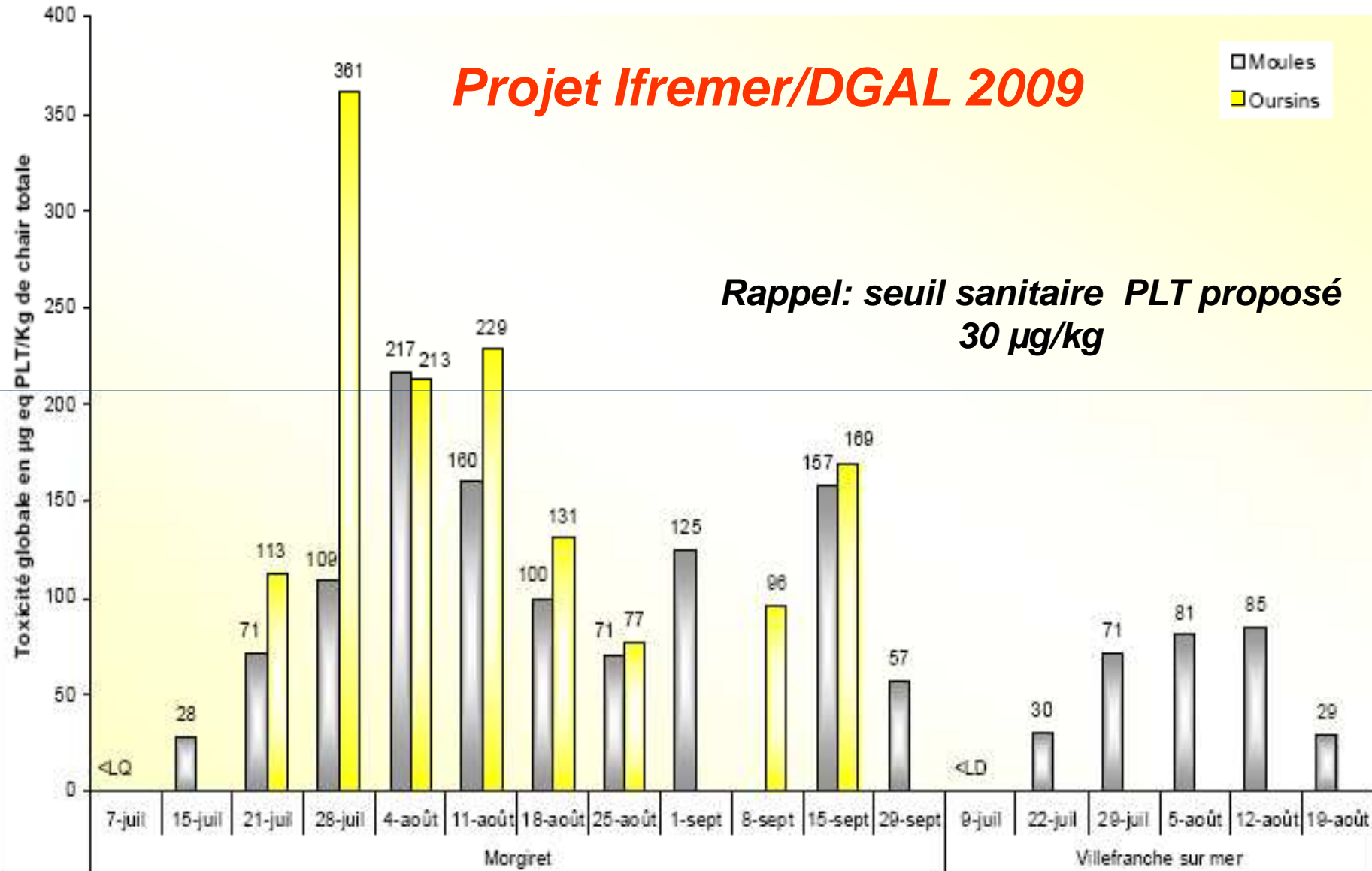


Evolution de la concentration des PLTs-like (Palytoxine et ovatoxin-a) dans les organismes marins de méditerranée au cours de l'été 2009

Projet Ifremer/DGAL 2009

□ Moules
 ■ Oursins

**Rappel: seuil sanitaire PLT proposé
 30 µg/kg**



Nota : Le tube digestif de l'oursin représente de 50 à 70% de la chair totale alors que celui des moules ne représente que 8 à 10%.

Adaptation du REPHY

- Depuis 2010: l'*Ostreopsis* a été intégré dans la liste des espèces à risques systématiquement répertoriées dans les listes floristiques (FT, FP et FPI), sur l'ensemble du littoral français.
Un seuil d'alerte (4 000 cell./l) déclenche la recherche en palytoxine et ovatoxine dans les coquillages produits sur zone.
- Depuis 2010, la recherche en Palytoxine et ovatoxine est réalisée mensuellement sur les oursins pendant la période de pêche autorisée (novembre – avril), sur quelques sites représentatifs
 - Côte Bleue
 - Îles du Frioul
 - Le Brusca
 - Ajaccio
 - îles de Lérins (prévu en 2012)

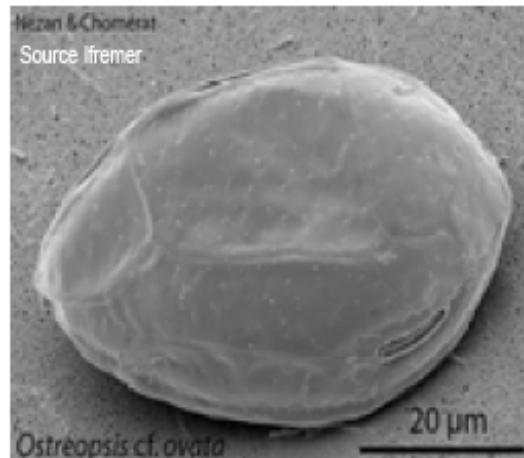
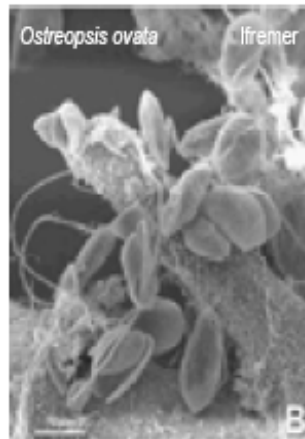
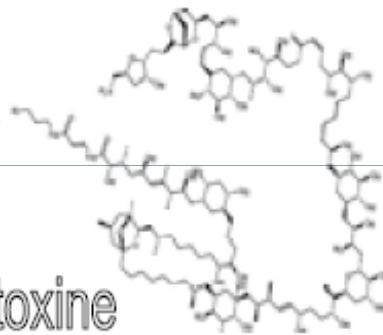
Contexte

Ostreopsis ovata

Algue microscopique unicellulaire
produisant une « palytoxine »

Groupe des dinoflagellés
(phytoplancton)

Palytoxine



Micro algue tropicale benthique toxique
du genre « *Ostreopsis* » → bloom en
Méditerranée.

Inhalation d'embruns marins
contaminés → épidémie à Gênes en
2005 avec admission aux urgences de
225 personnes et 20 hospitalisations
pour syndromes respiratoires fébriles.

Marseille, îles du Frioul, septembre
2006 → des baigneurs et plongeurs →
irritations cutanées et muqueuses
survenant 2 à 6 heures après
exposition.

Prévention

- Information du public / risque santé
- Restriction ou fermeture temporaire de baignade
- Rappel interdiction de pêche d'oursins en saison estivale

Recommandations (pêche de loisir) de non consommation de produits de la mer pêchés sur les sites de bloom.

Affiche d'information *Ostreopsis* 2010

destinée au **grand public** présent sur les **plages**

les **postes de secours** des **plages**,

les **pharmacies** du littoral,

les **centres de plongées**

INFORMATION ALGUE MICROSCOPIQUE (OSTREOPSIS OVATA)

Qu'est-ce qu'*Ostreopsis Ovata* ?

C'est une algue tropicale microscopique toxique qui se développe actuellement sur les rivages de la Méditerranée.

Quels sont les effets sur les baigneurs, les plongeurs ?



Gout métallique de l'eau, Mal à la gorge, yeux qui piquent ou qui coulent, Nez bouché ou qui coule, Fièvre >38°C, Envie de vomir, Difficultés à respirer, Rougeurs de la peau et/ou démangeaisons

Ces symptômes (bénins) apparaissent au bout de quelques heures (2 à 6 heures) et diminuent habituellement après une période de 24 à 48 heures, sans complications ultérieures.

Les personnes à proximité immédiate de la mer (bord de mer, pêche à la ligne, plaisance...) peuvent aussi présenter ; toux, fièvre, syndrome pseudo grippal, suite à l'inhalation et à l'exposition à des embruns marins.



Source: Direction de l'Environnement et de la Mer de Marseille

enveloppant les rochers et tout ce qui se trouve sur les fonds. Flocons de matière en suspension qui, en contre-jour présentent des reflets rougeâtres.

Comment la repérer ?

En surface : Présence de mousses superficielles
Matière en suspension de consistance gélatineuse

Sous l'eau :

Pellicule brune
d'aspect
membraneux



Source: LISA MARCAMP

Des symptômes ? *Ostreopsis* repérée ?



Source: LISA MARCAMP

Qui prévenir ?

LE POSTE DE SECOURS DES PLAGES LE PLUS PROCHE OU LA PHARMACIE.

Centralisation des signalements de tout le littoral méditerranéen : **CENTRE ANTI-POISON (CAIP Marseille) : 04 91 75 25 25**

En présence d'*Ostreopsis*, certains produits de la mer (oursins, coquillages, crabes, poissons...), peuvent concentrer la toxine d'*Ostreopsis* (palytoxine) et présenter des risques lors de leur consommation. Il est recommandé aux personnes pratiquant la pêche de loisir d'éviscérer les poissons avant leur consommation et de ne pas consommer les autres produits de la mer. Rappelons qu'en été et en méditerranée, la pêche aux oursins est interdite

En présence d'*Ostreopsis*, certains produits de la mer (oursins, coquillages, crabes, poissons...), peuvent concentrer la toxine d'*Ostreopsis* (palytoxine) et présenter des risques lors de leur consommation. Il est recommandé aux personnes pratiquant la pêche de loisir d'éviscérer les poissons avant leur consommation et de ne pas consommer les autres produits de la mer. Rappelons qu'en été et en méditerranée, la pêche aux oursins est interdite

De l'évènement du Frioul de l'été 2006 à 2011, les programmes de recherche, les études et les surveillances mises en place ont montré la présence de l'Ostreopsis :

- **dans les Alpes-Maritimes (sites du projet Médios)**
- **à Monaco**
- **en rade de Toulon (anse de Méjean)**
- **en rade de Marseille (îles du Frioul)**
- **sur les sites de la surveillance « baignade », mais en général de manière faible et épisodique. Observations surtout en Corse**

Mais: nombre de secteurs du littoral ne disposent pas encore d'informations permettant par exemple de renseigner le profil des eaux de baignade en application de la directive 2006/7/CE du Parlement européen sur les aspects liés à l'*Ostreopsis*

Projet OSCREEN

**Screening sur le littoral français
méditerranéen du stock d'*Ostreopsis sp.*
macroalgal**

Volet 1 : approche géographique

**Volet 2: influence des paramètres
environnementaux sur le stock
d'*Ostreopsis sp.* macroalgal**



Avec le soutien financier de



*Hubert Grosse / Ifremer
Aurélie Blanfuné / Ecomers
Thierry Thibaut / Ecomers
Camille Brissac / Ifremer
Nicolas Ganzin / Ifremer*

LANGUEDOC-ROUSSILLON

PROVENCE-ALPES-COTE D'AZUR

Zoom 2

Zoom 1

Zoom 3

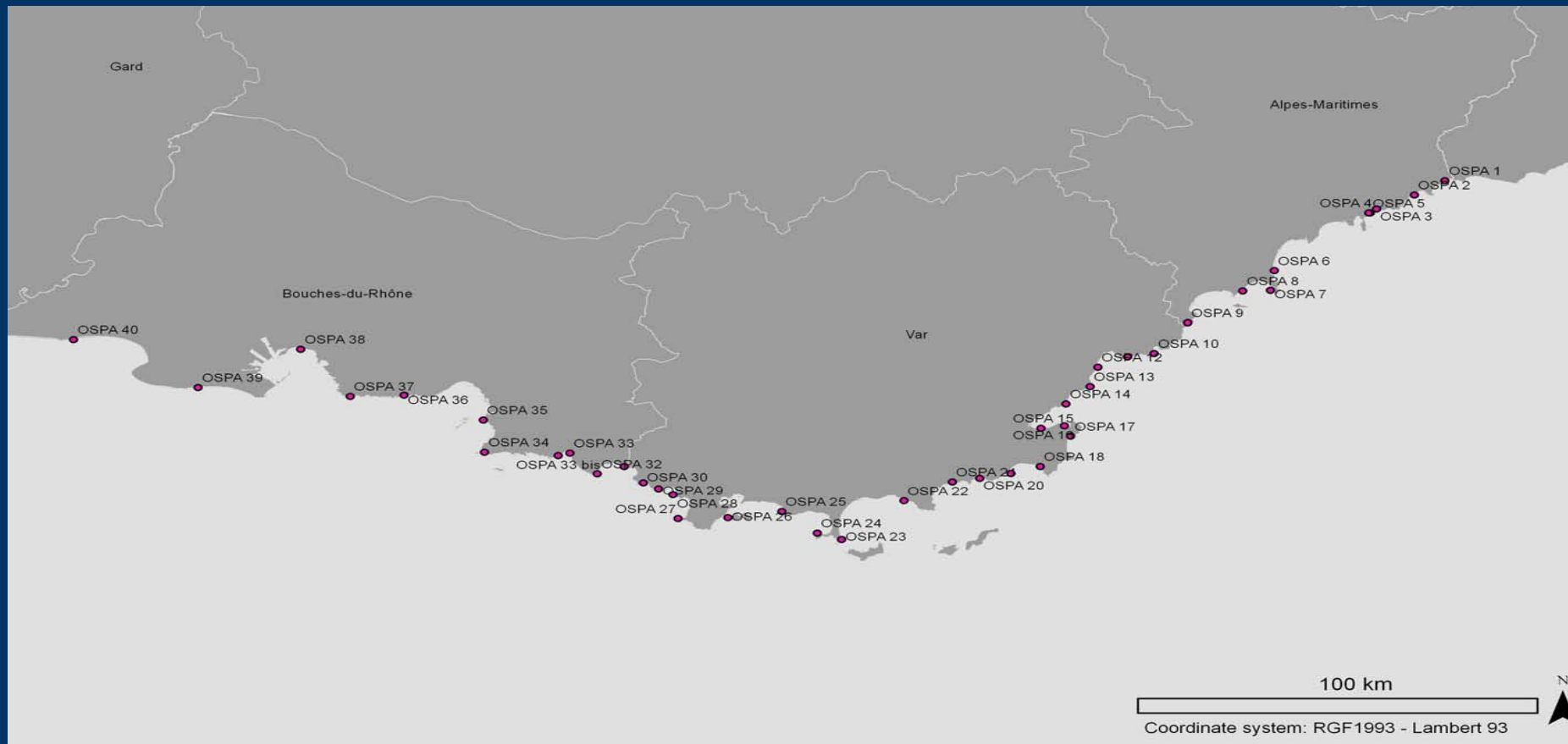
CORSE



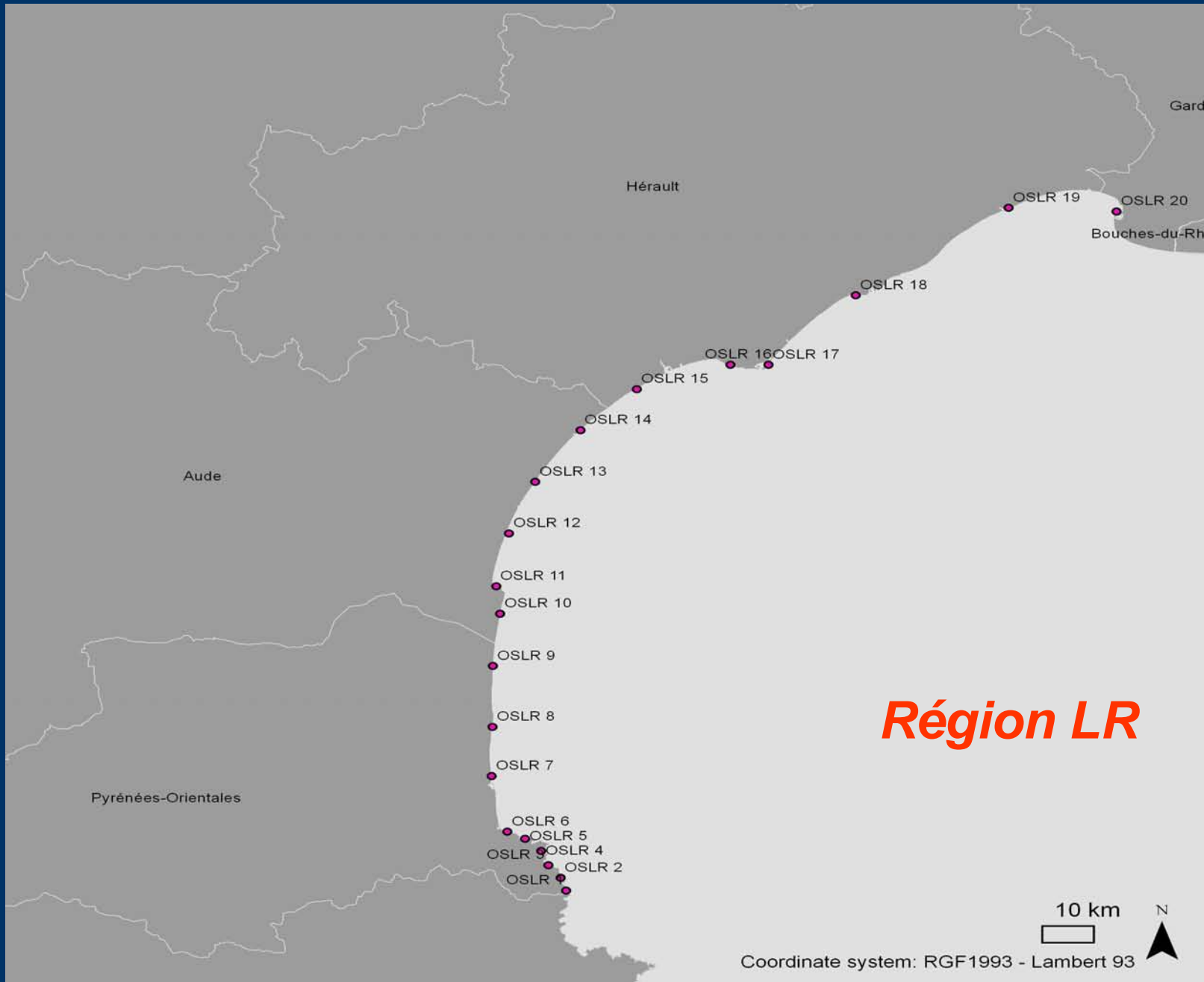
Ifremer
C/To/Ler-Pac/22-06-10

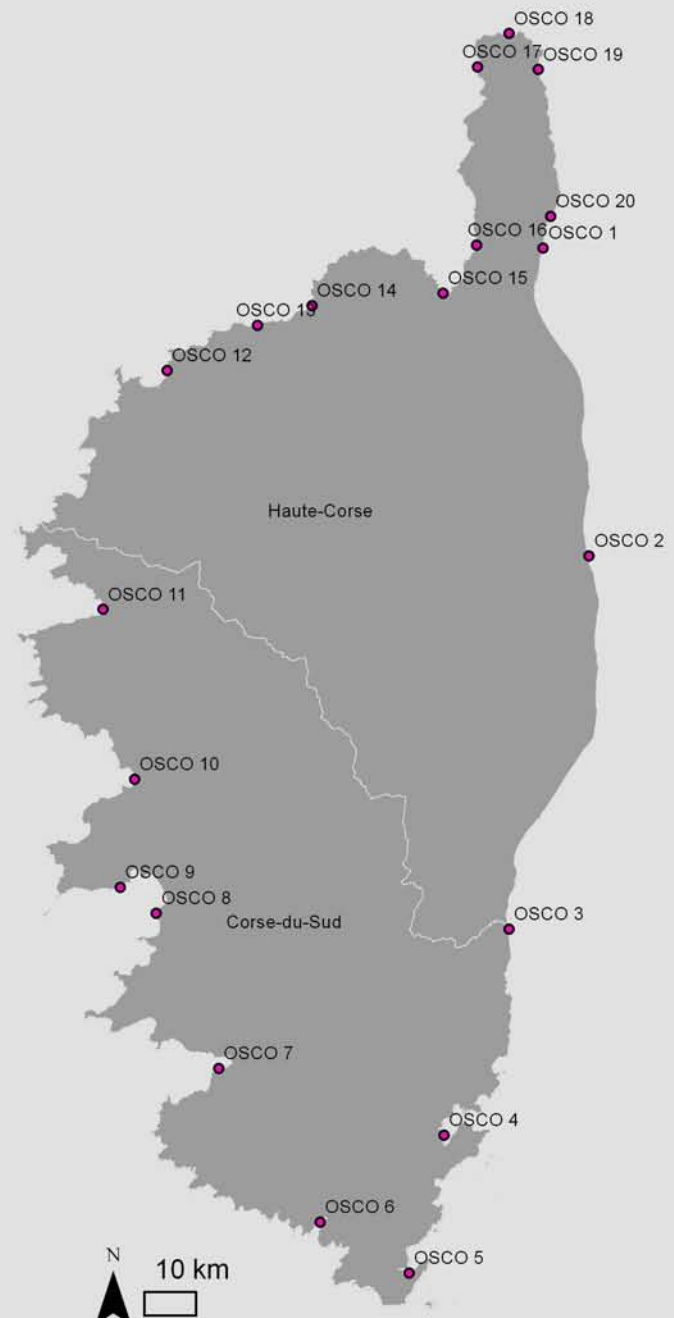


Sources: AERM&C, IGN, SHOM.



Région PACA





Corse

recherche de sites rocheux ou enrochements avec couverture macroalgale

| | | |
|-------------|----------------|--|
| OSCO 9 | Ajaccio centre | Restaurant « le Cabanon Bleu » algues +++ |
| N 41°54.618 | E 08°43.349 | |



| | | |
|-------------|-------------|---|
| OSCO 19 | Maccinaggio | Sur digue nord du port En face du club nautique. |
| N 42°57,659 | E 09°27,178 | |



Ifremer

CIo/Lev-Pac/22-03-11

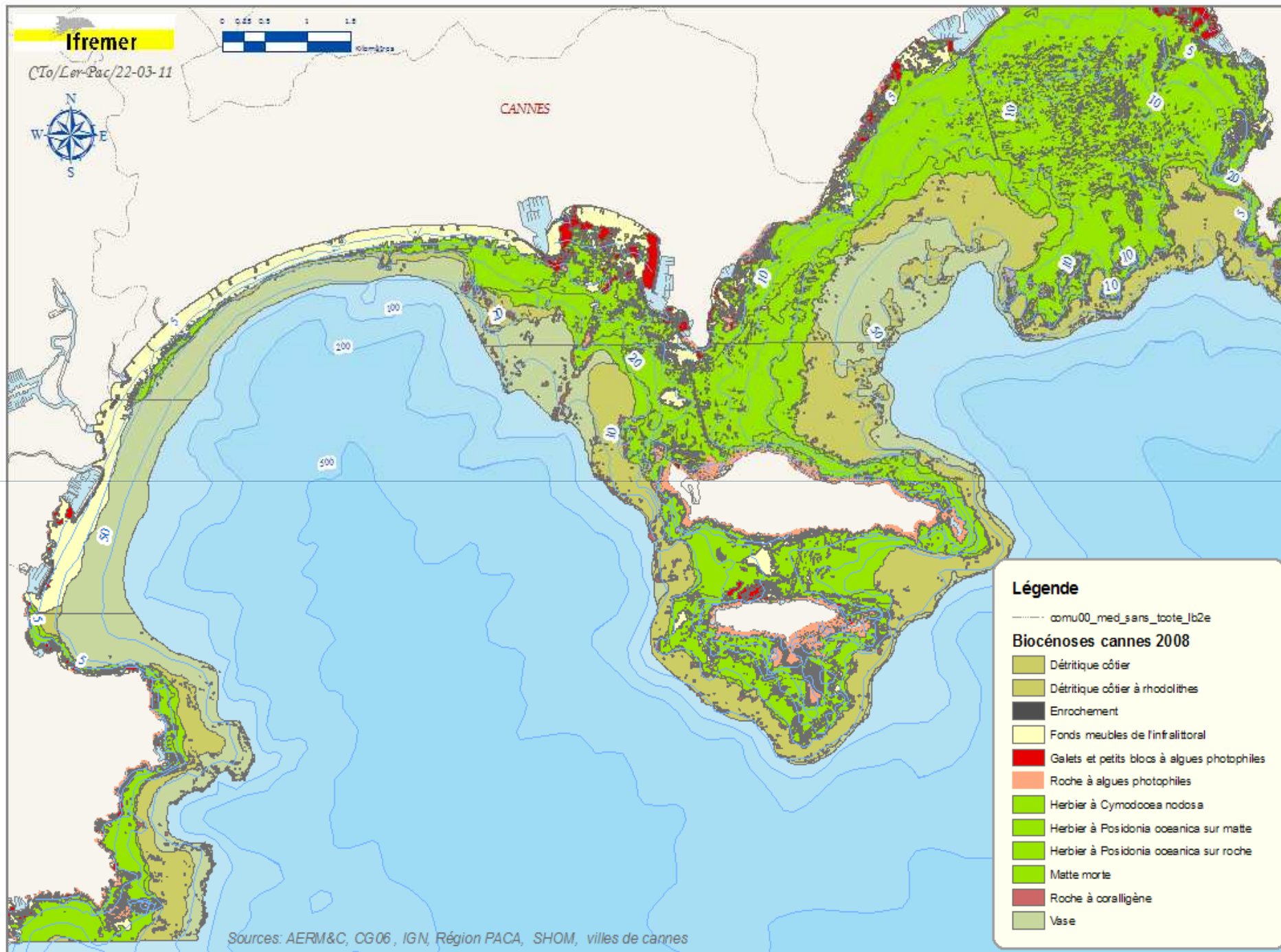
0 0.25 0.5 1 1.5



Kilomètres



CANNES



Légende

--- comu00_med_sans_toote_lb2e

Biocénoses Cannes 2008

- Détritique côtier
- Détritique côtier à rhodolithes
- Enrochement
- Fonds meubles de l'infralittoral
- Galets et petits blocs à algues photophiles
- Roche à algues photophiles
- Herbier à *Cymodocea nodosa*
- Herbier à *Posidonia oceanica* sur matie
- Herbier à *Posidonia oceanica* sur roche
- Matie morte
- Roche à coralligène
- Vase

Sources: AERM&C, CG06, IGN, Région PACA, SHOM, villes de Cannes

**Choix des macroalgues à échantillonner
en tant que support de l'*Ostreopsis*:**

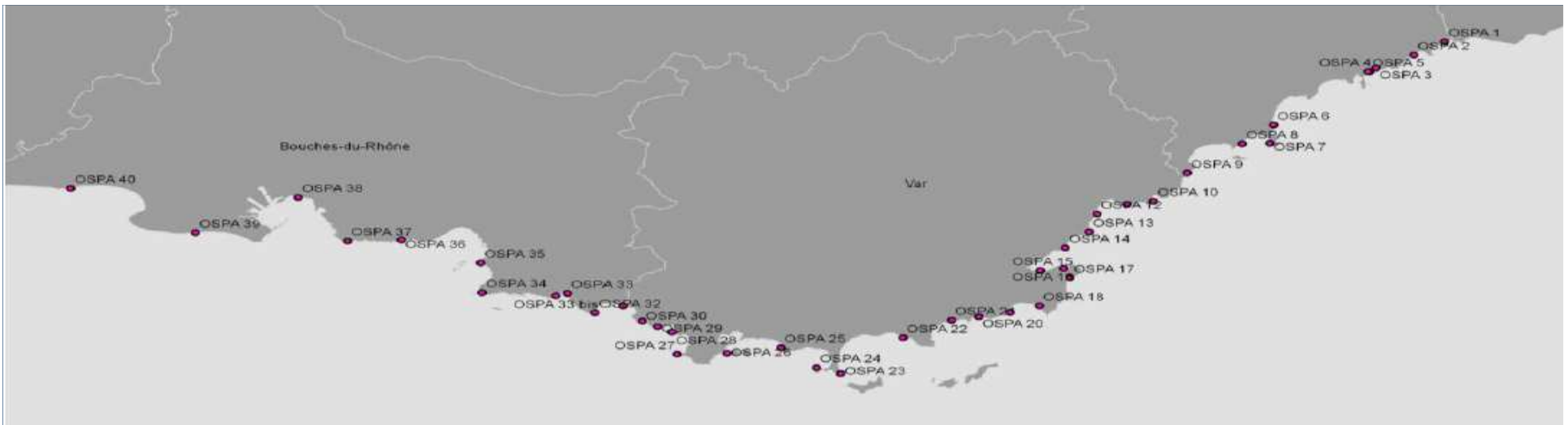
*principal problème méthodologique:
lesquelles choisir ?*



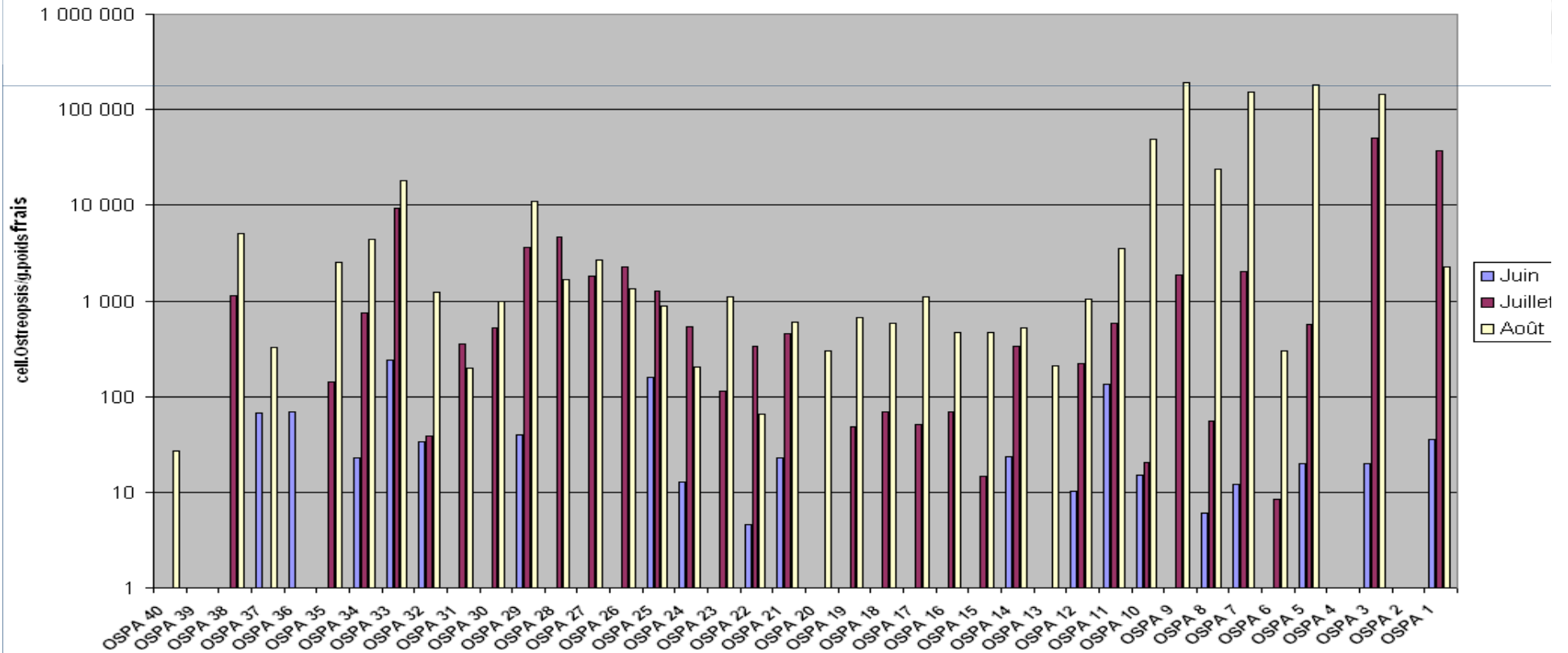
Corallinales

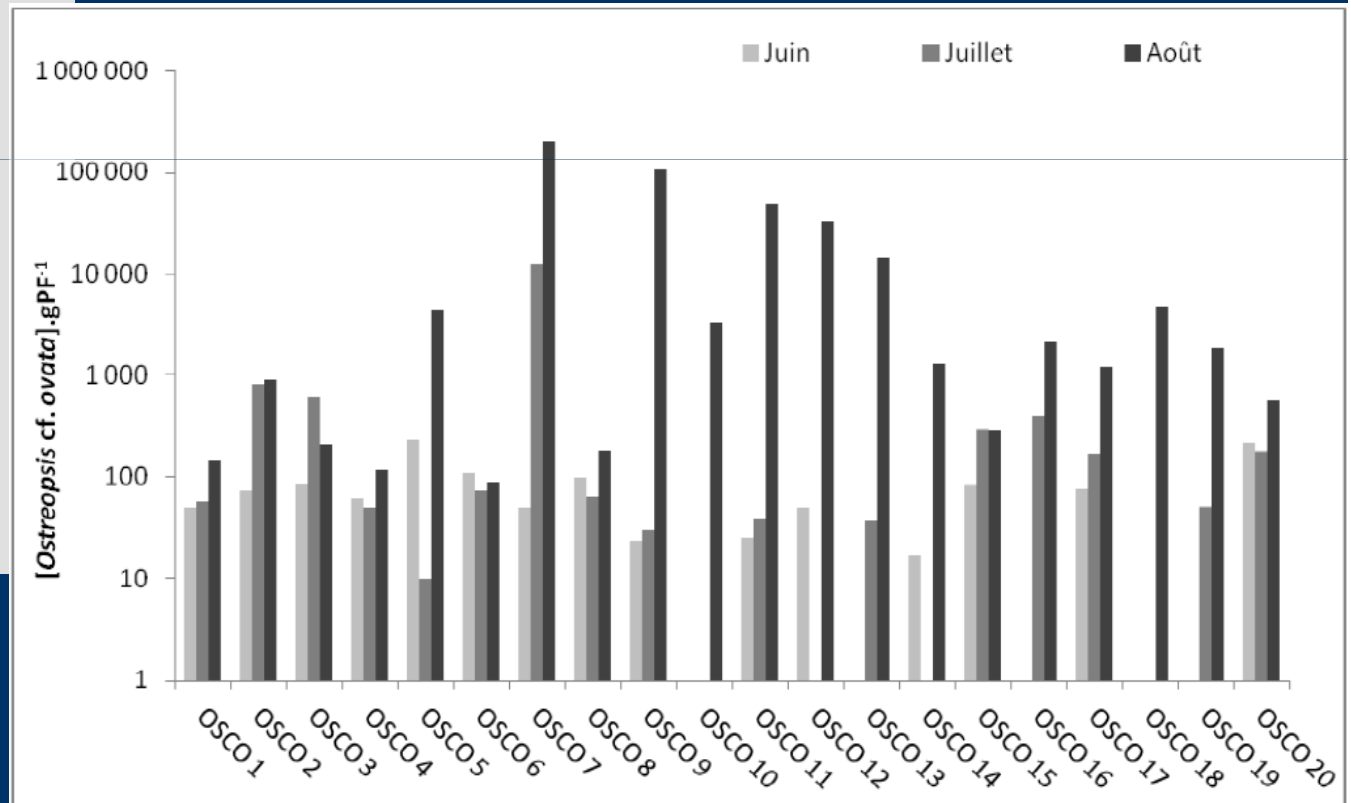
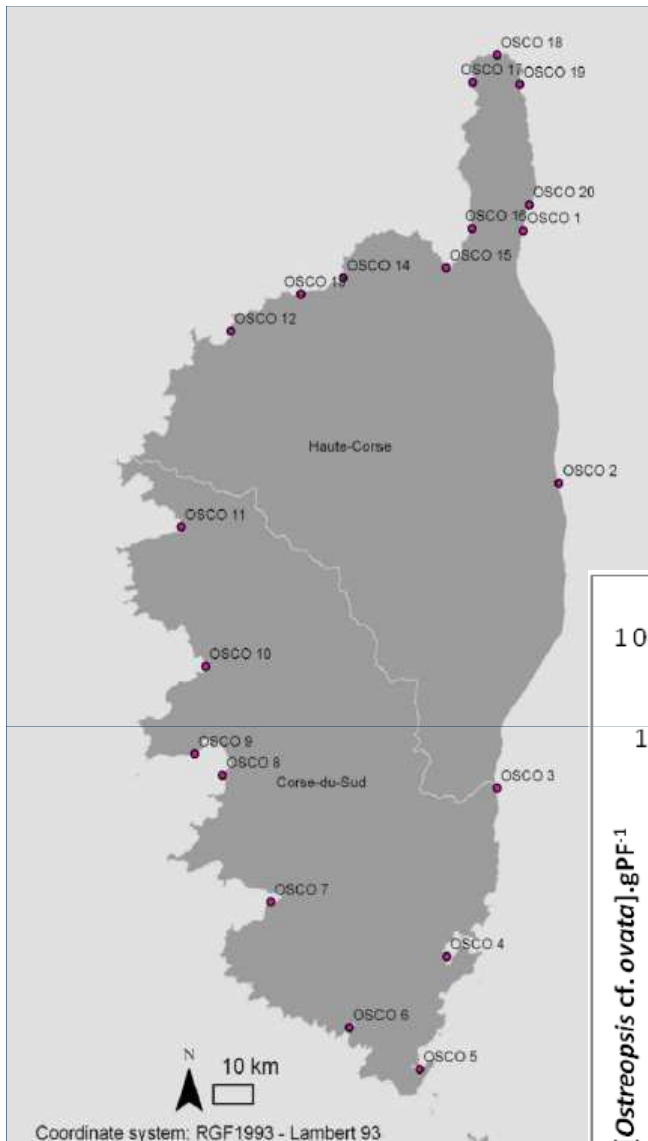


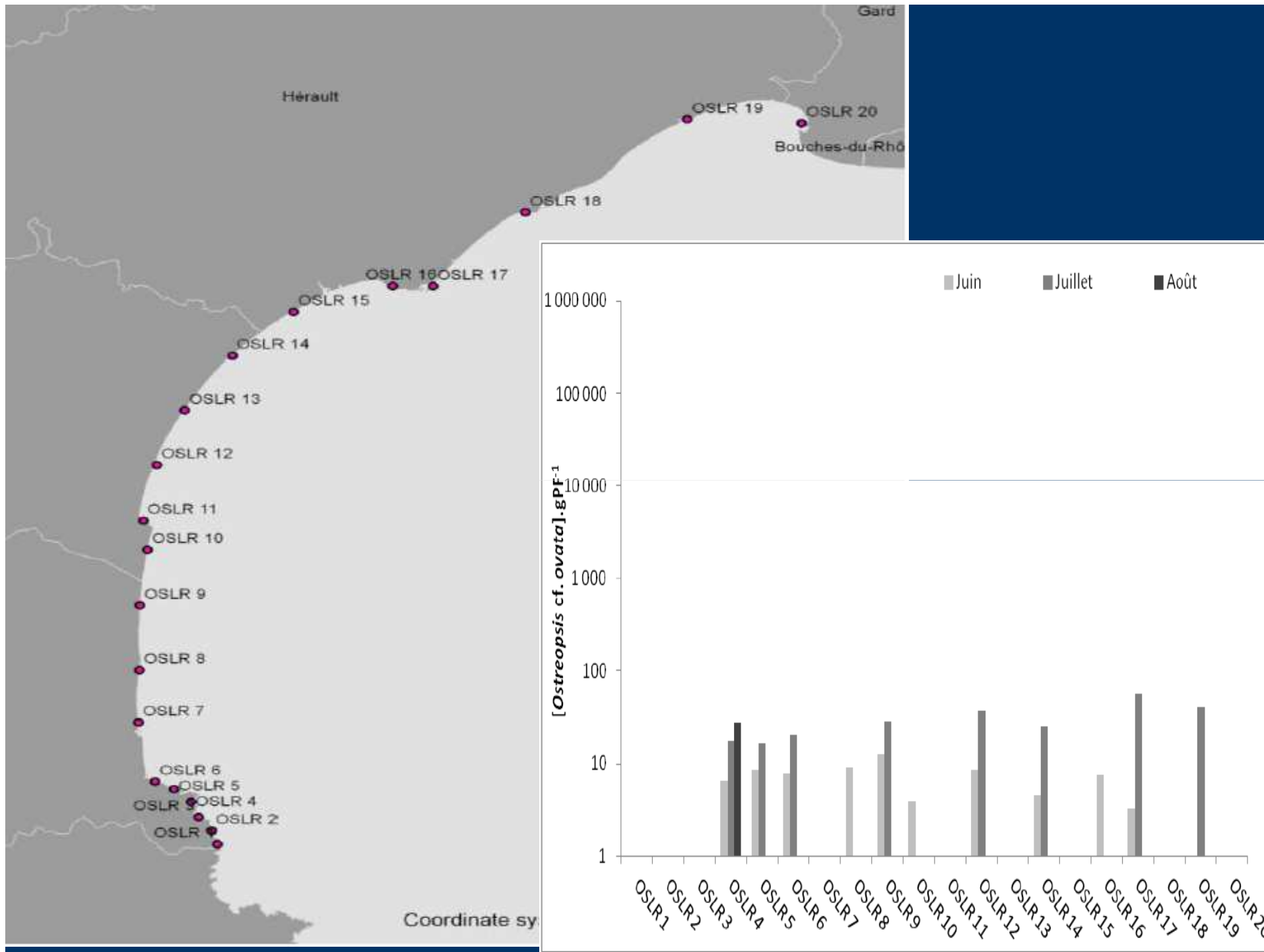
Dictyotales



Ostreopsis macro-algal en région PACA

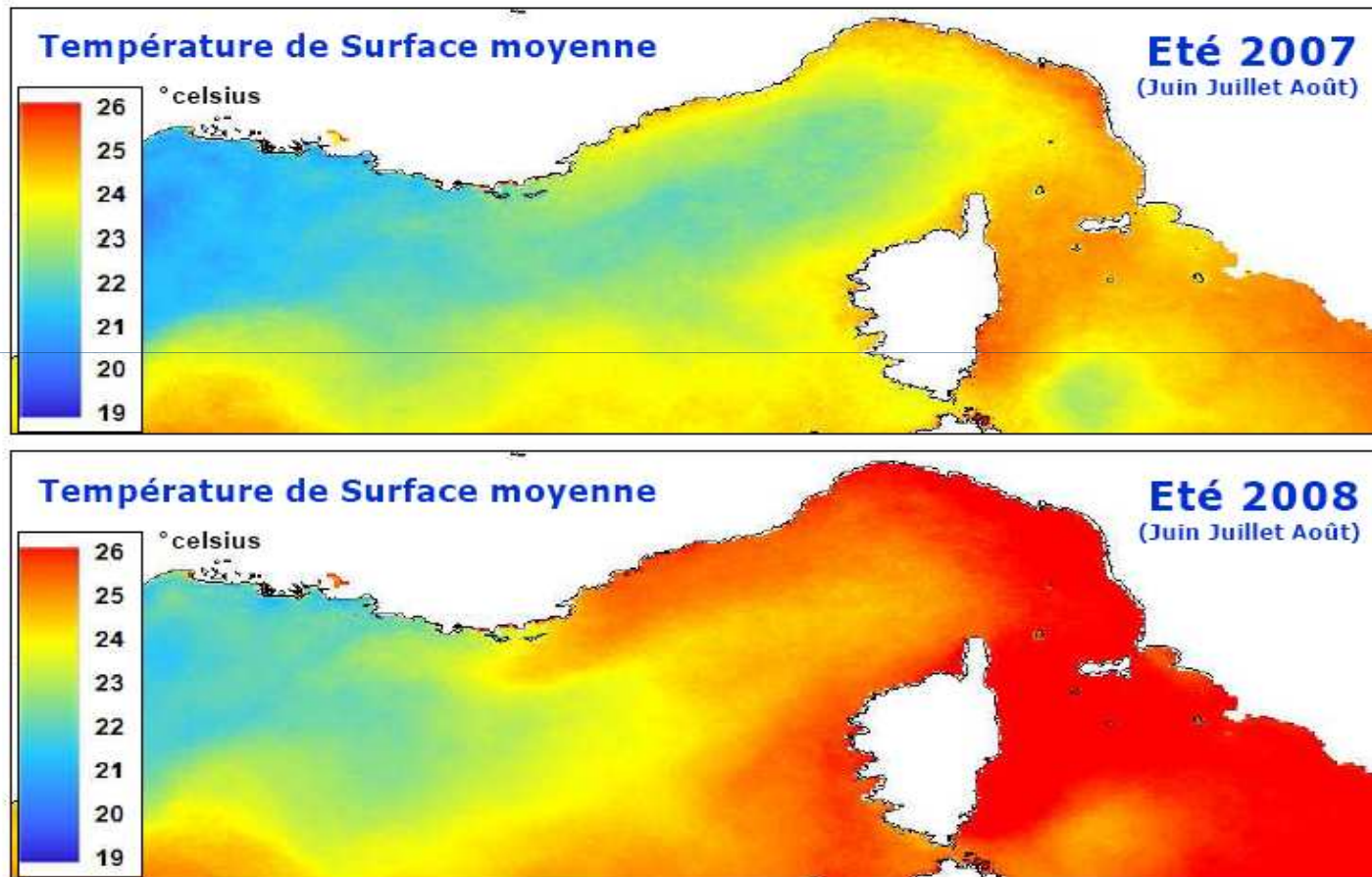




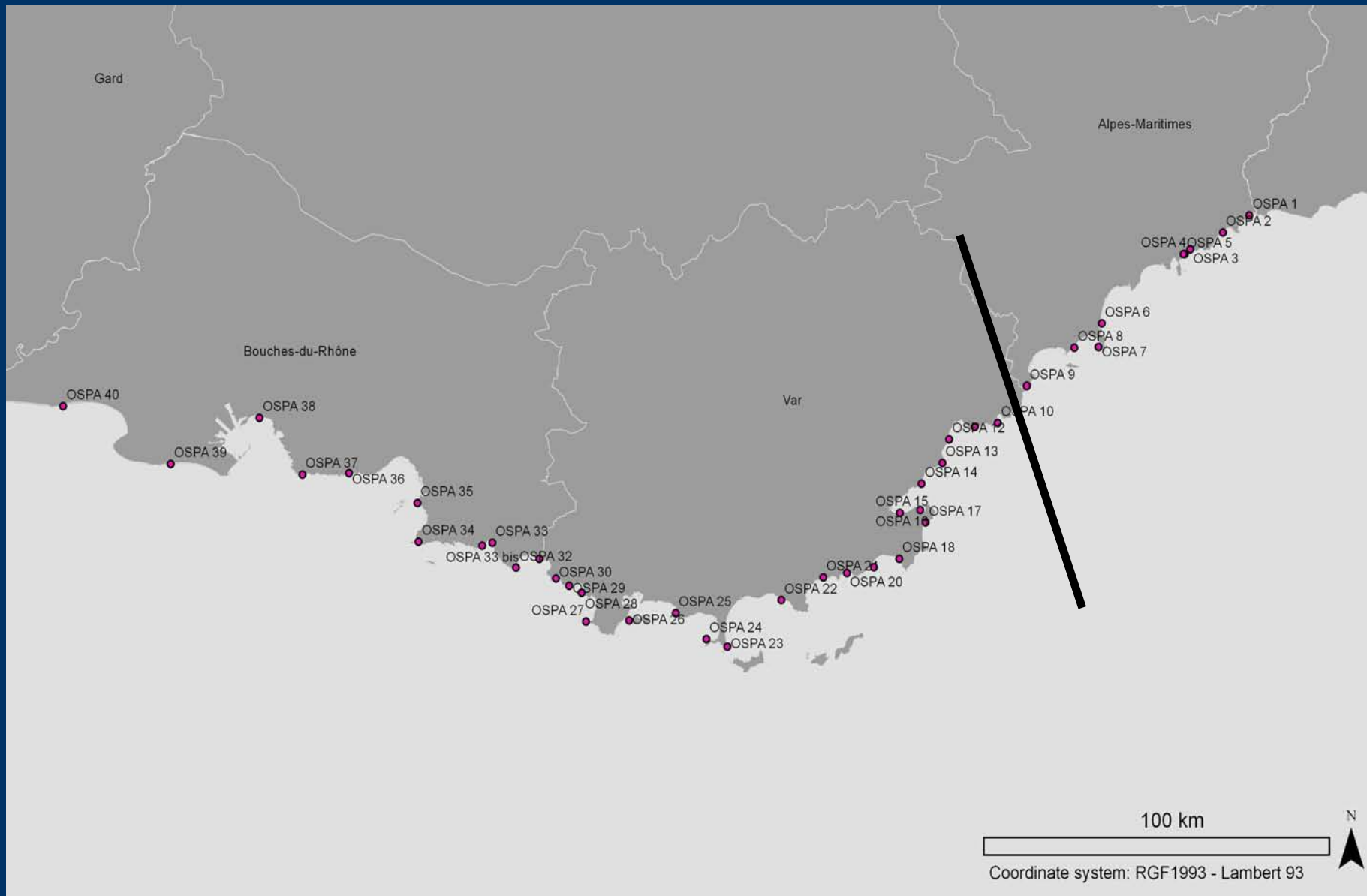


Cette étude suggère que les sites ayant une forte couverture algale composée de *Halopteris scoparia*, *Jania rubens* et *Laurencia obtusa* sont plus susceptibles de supporter des développements massifs d'Ostreopsis.

« Caractérisation environnementale du développement et du passage en suspension de l'algue toxique *Ostreopsis* à l'aide de données spatialisées »

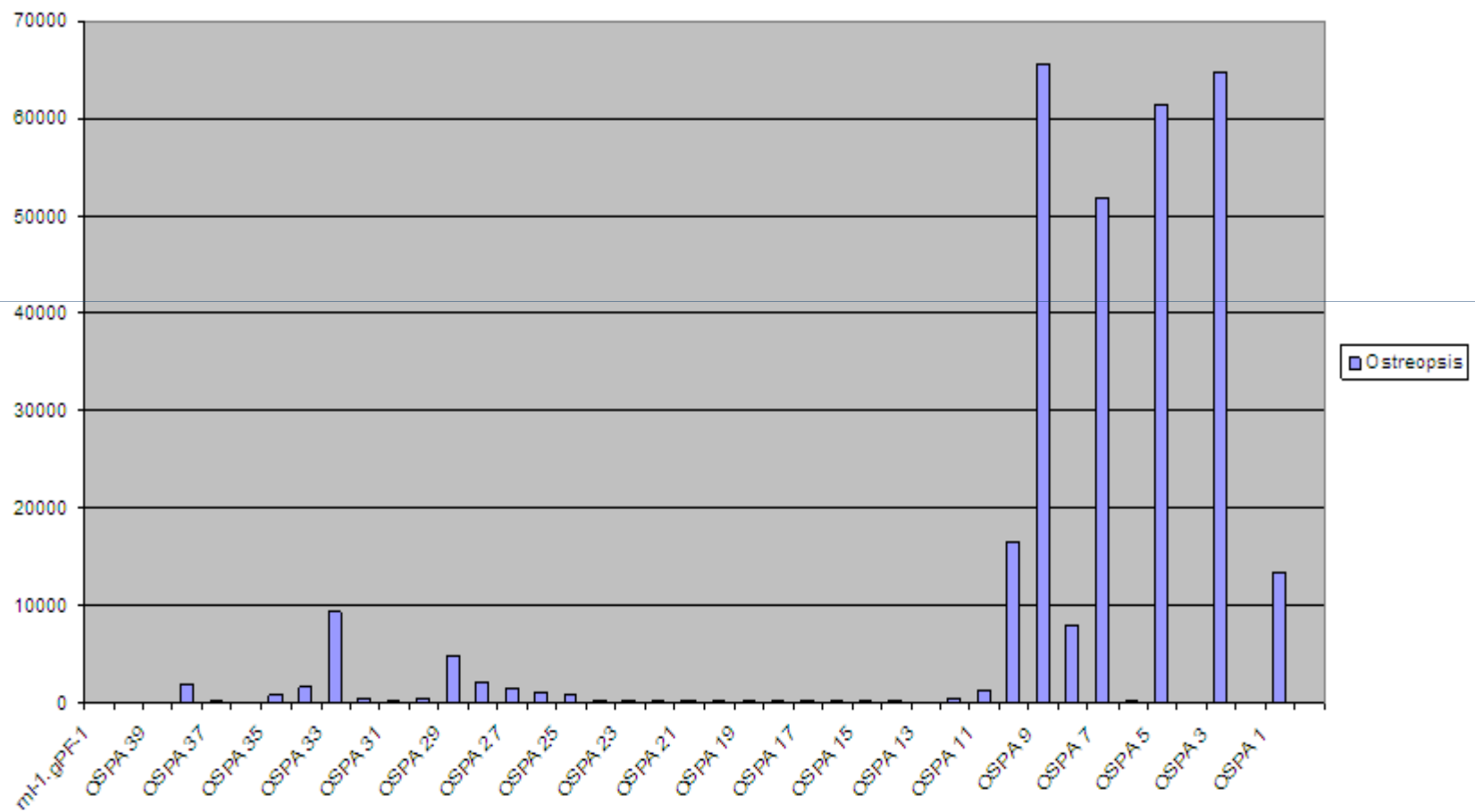


Images moyennes saisonnières de température de surface (moyenne des SST satellites pour les mois de juillet, août et septembre) pour les années 2007 et 2008

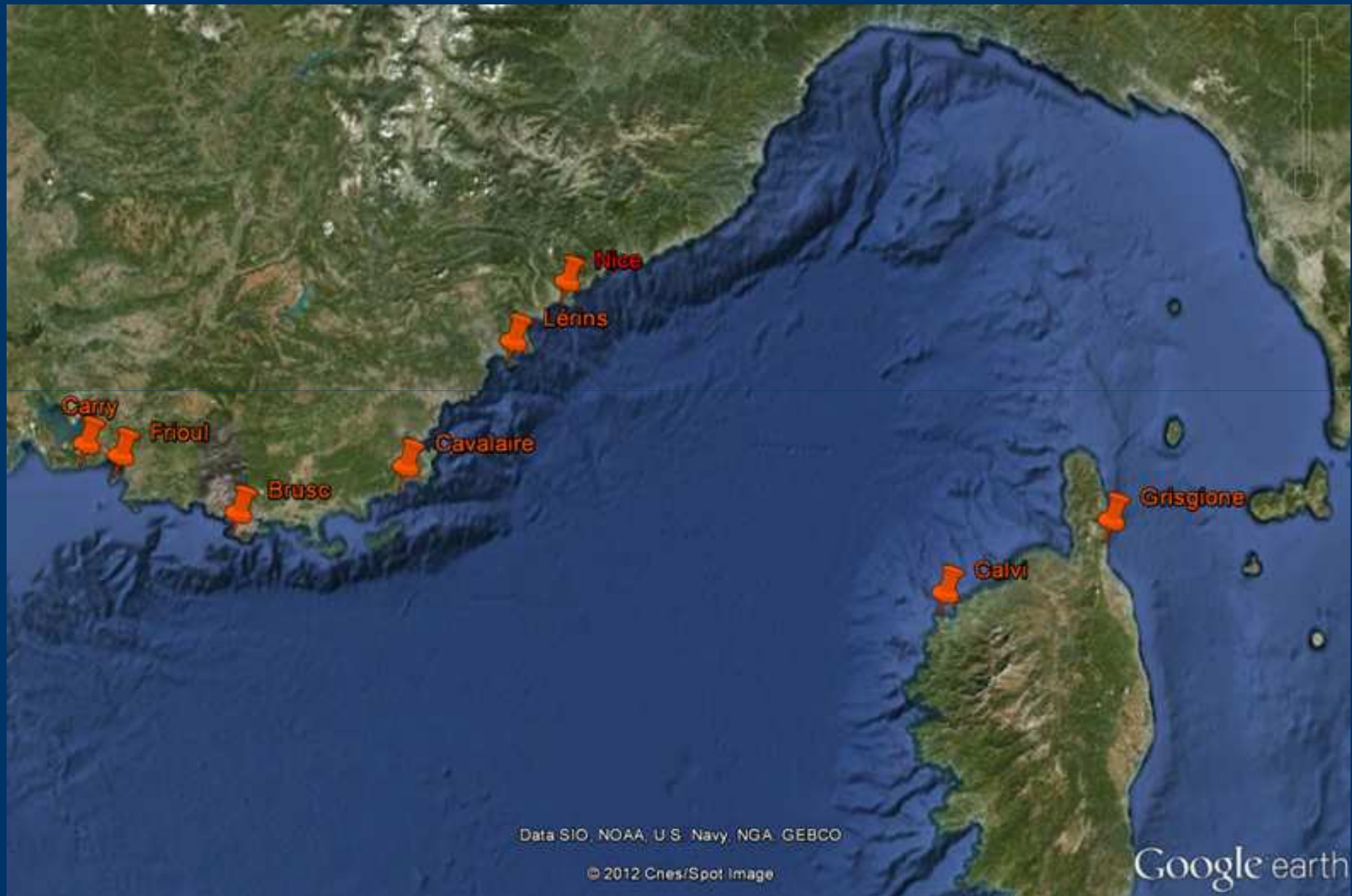


Dénombrement d'*Ostreopsis macroalgal* (moyenne juin-juillet-août 2011)

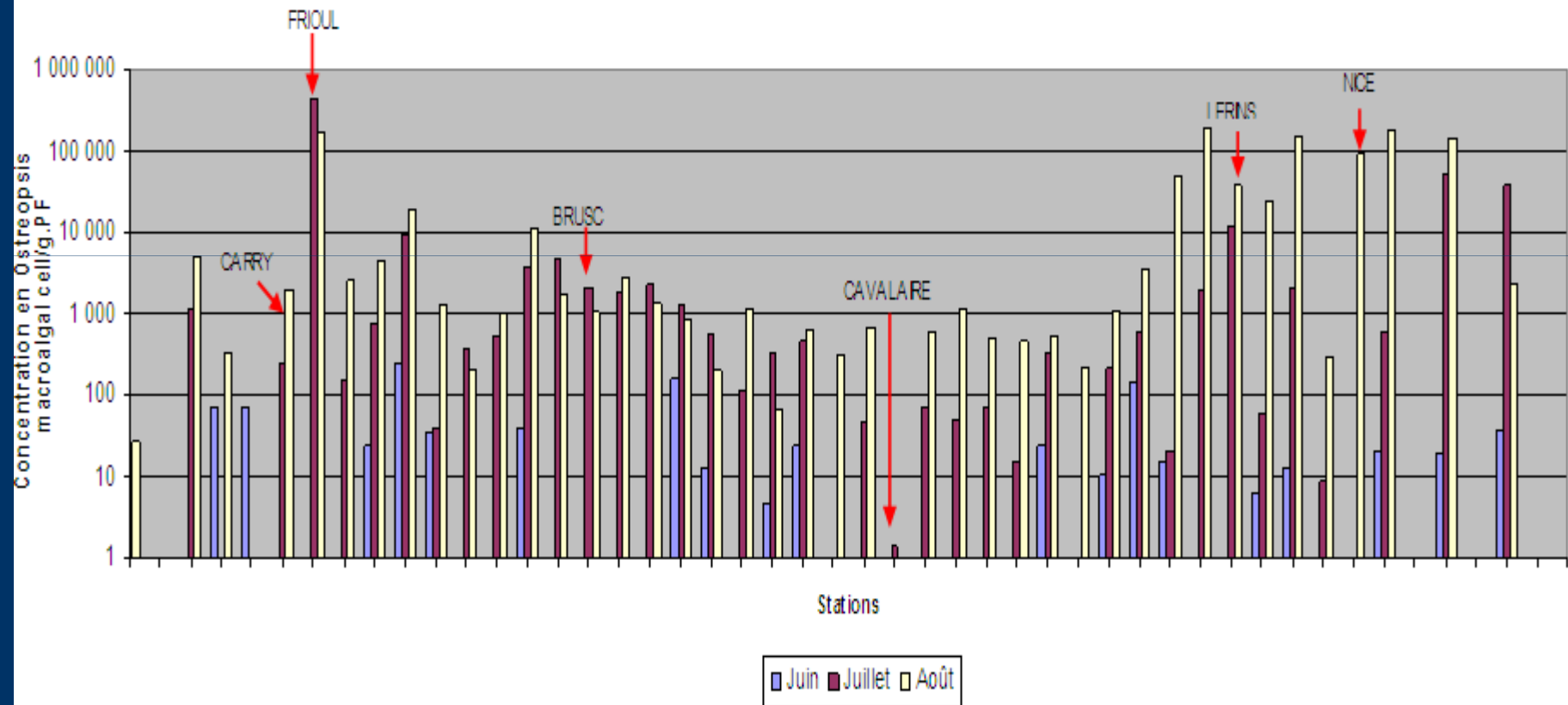
Ostreopsis moyenne juin-août
(nb de cellules / gPF)



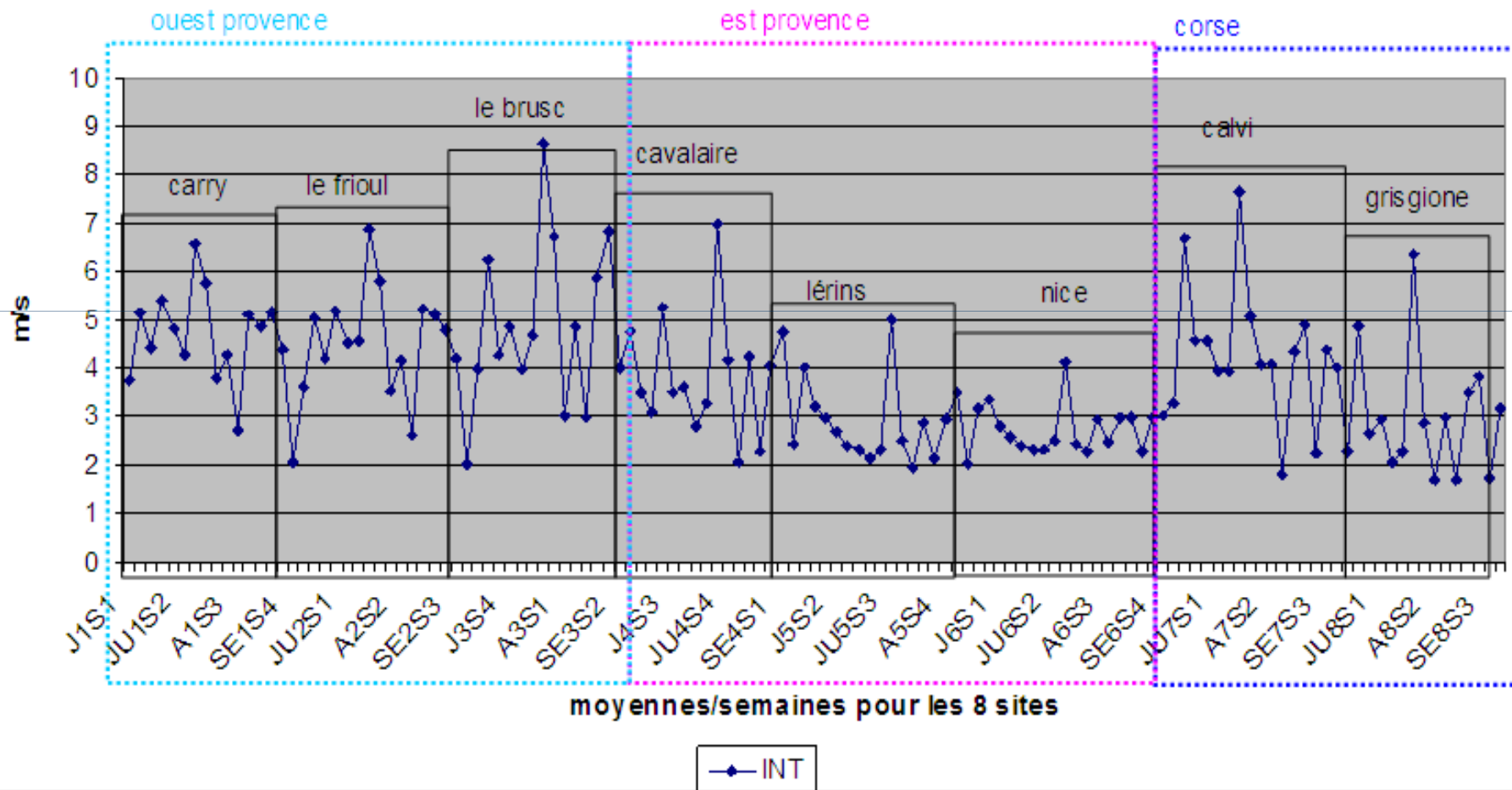
Les stations du volet 2

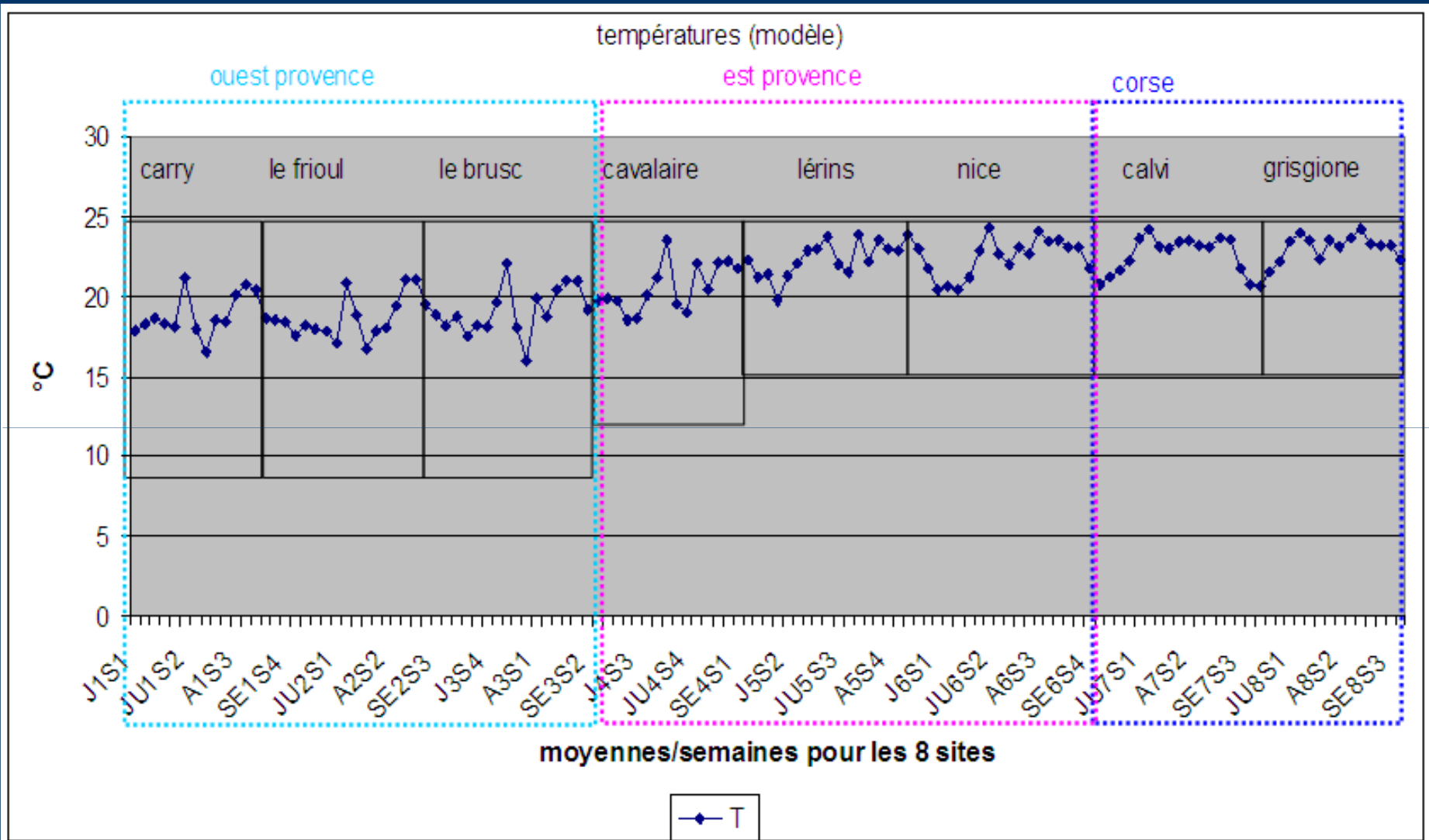


Evolution spatio-temporelle de l'Ostreopsis macroalgal: insertion des stations du volet 2 dans le volet 1 PACA

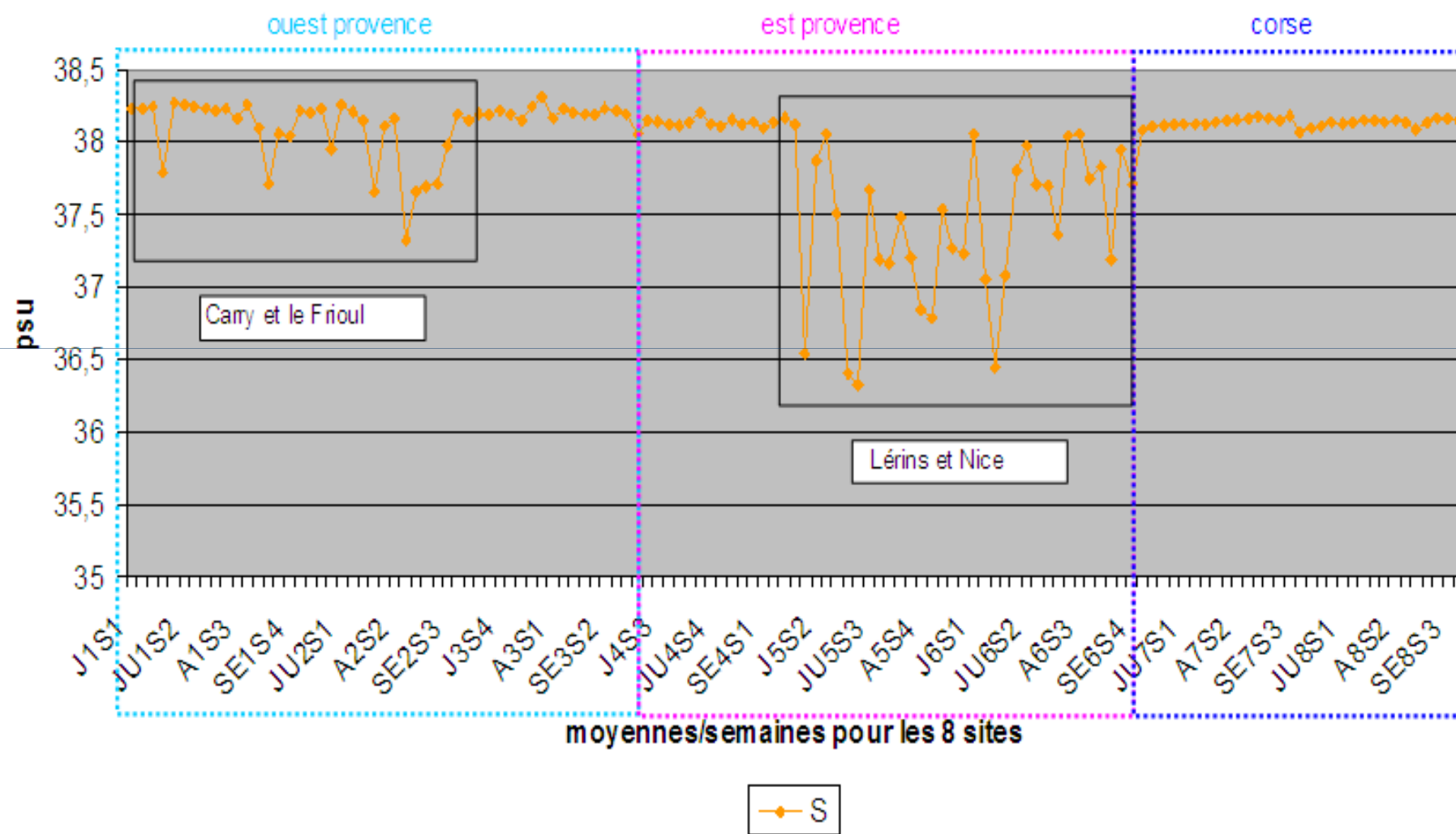


intensité vents (modèle)

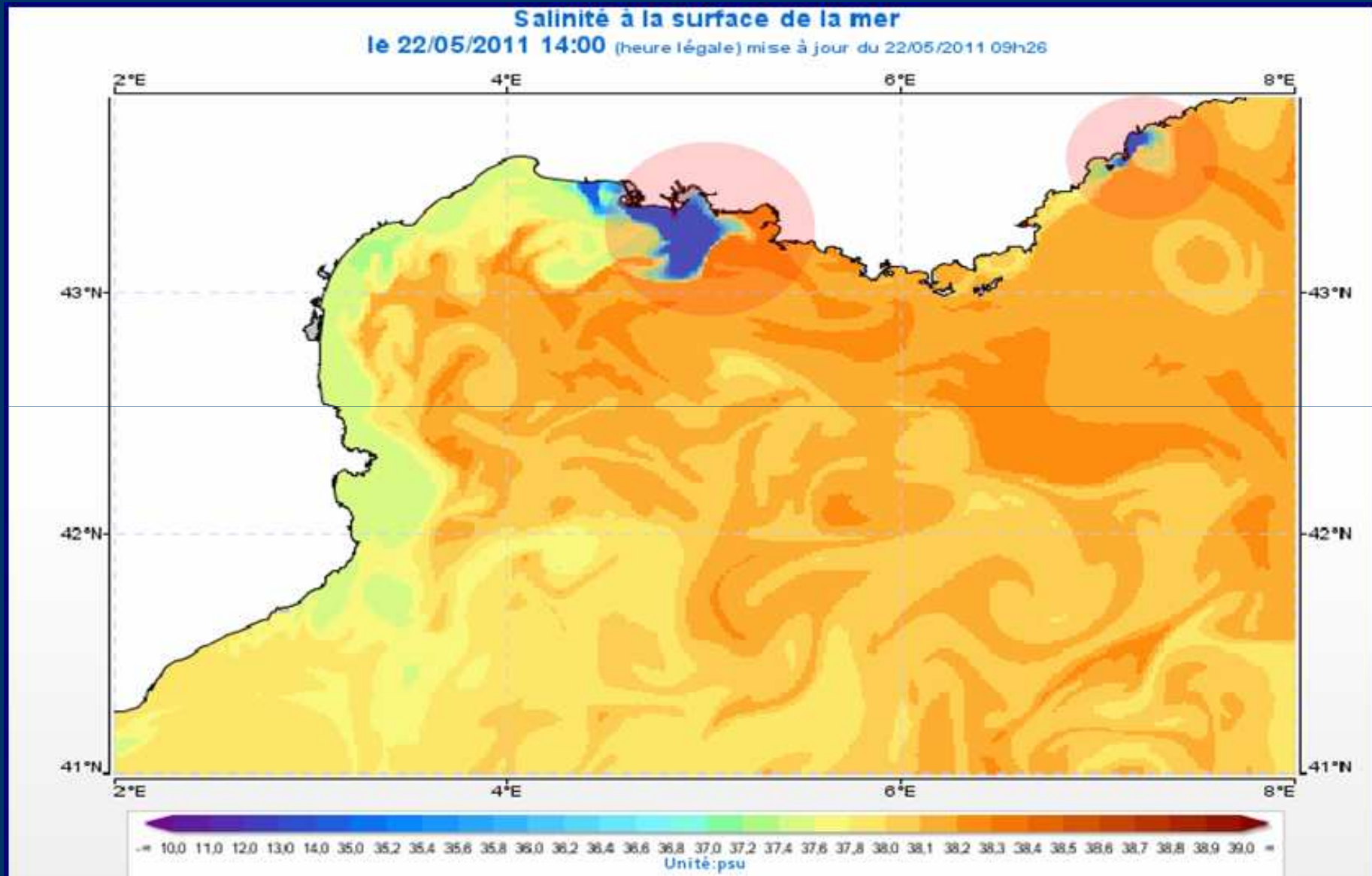




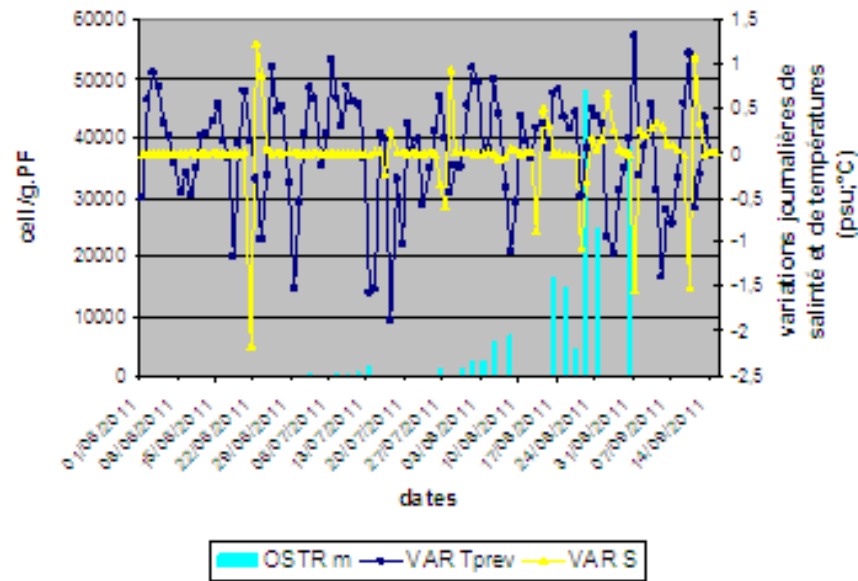
Salinité (modèle)



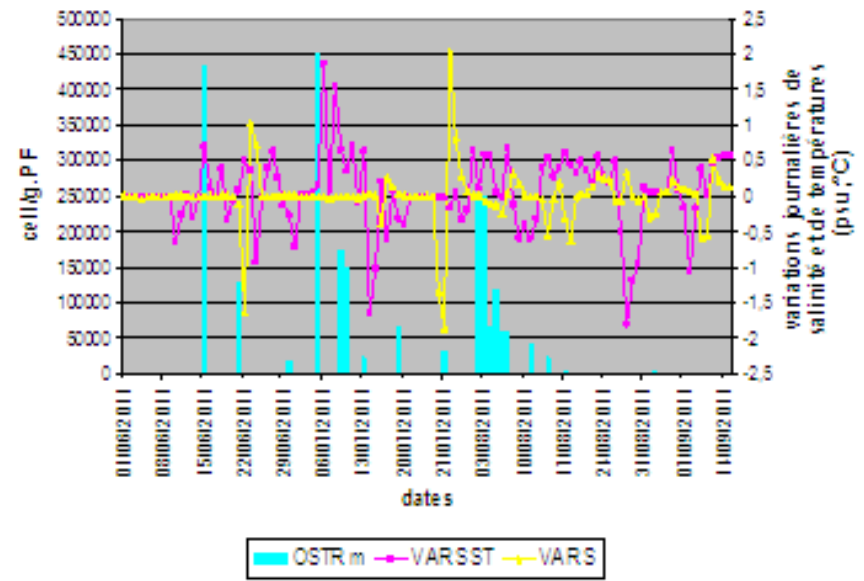
Exemple de représentation des variations de salinité issue du modèle



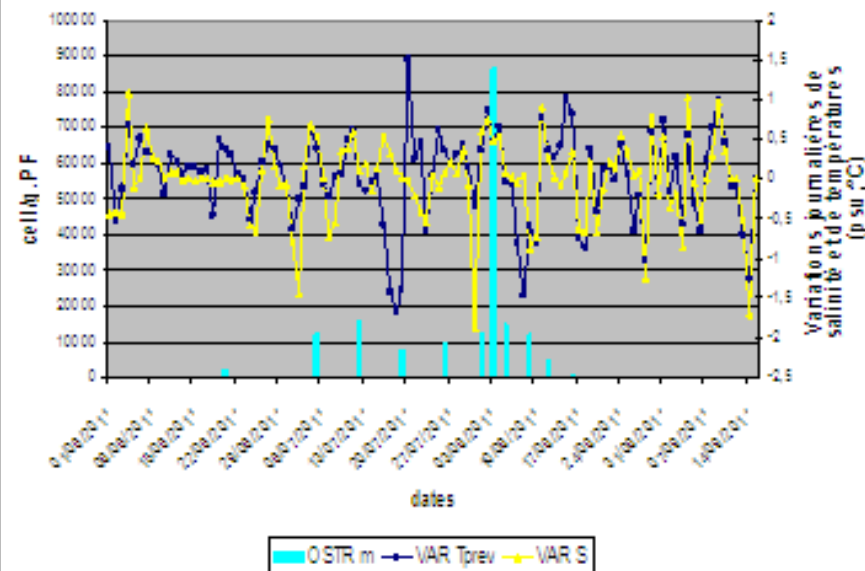
CARRY



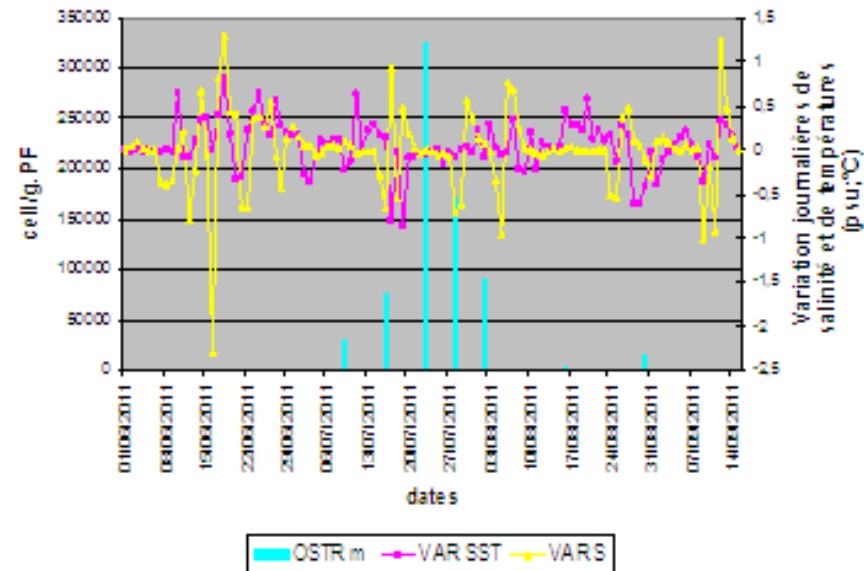
FRIUL



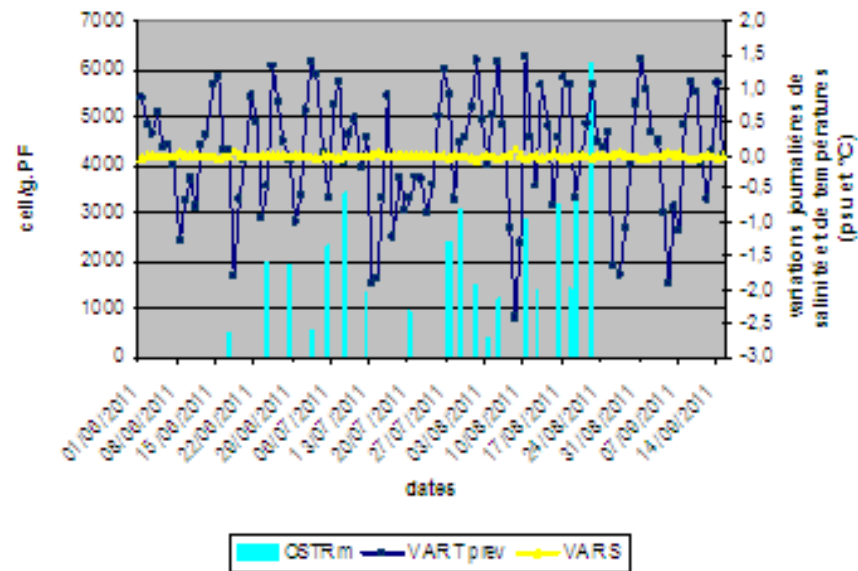
LERINS



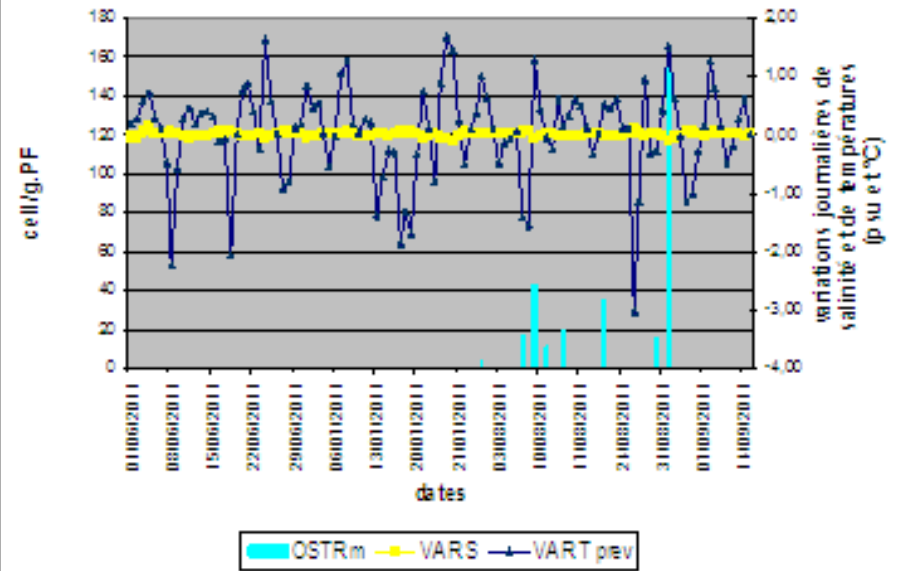
NICE



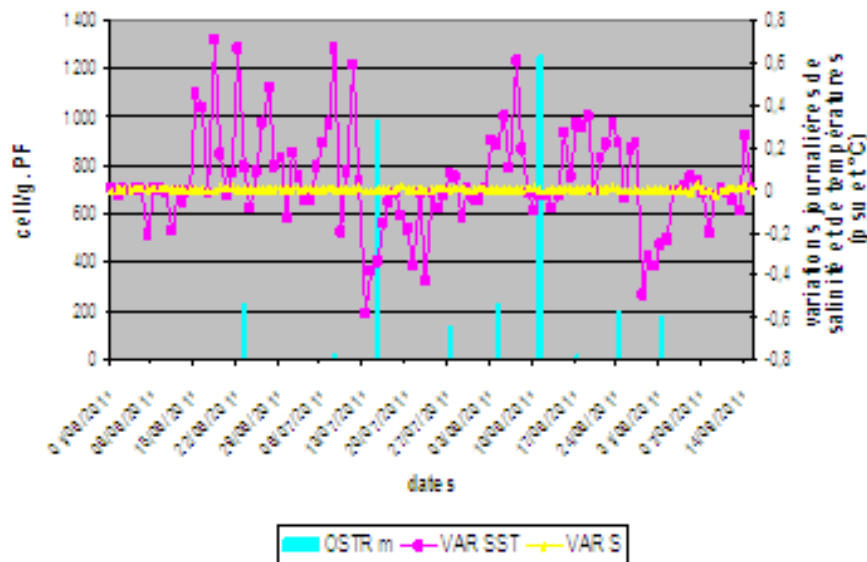
LE BRU SC



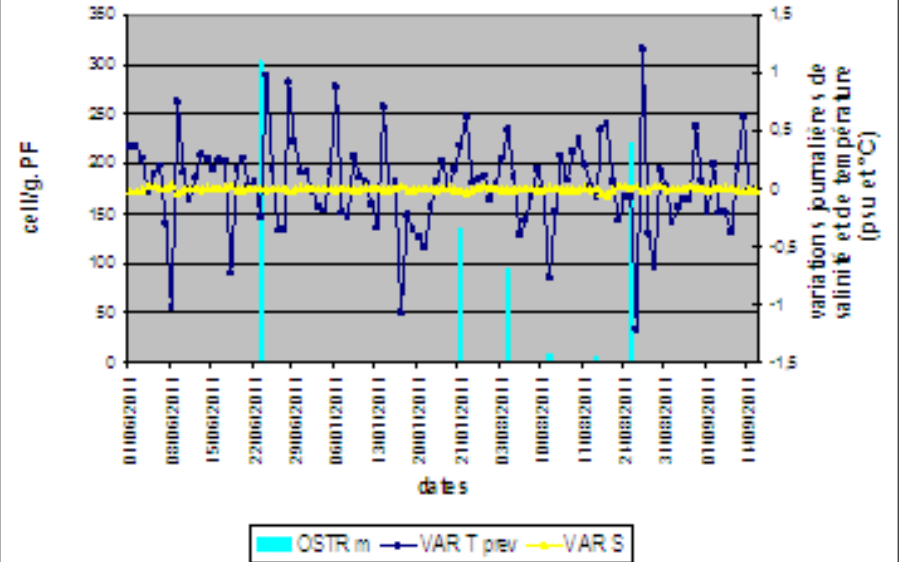
CAVALAIRE



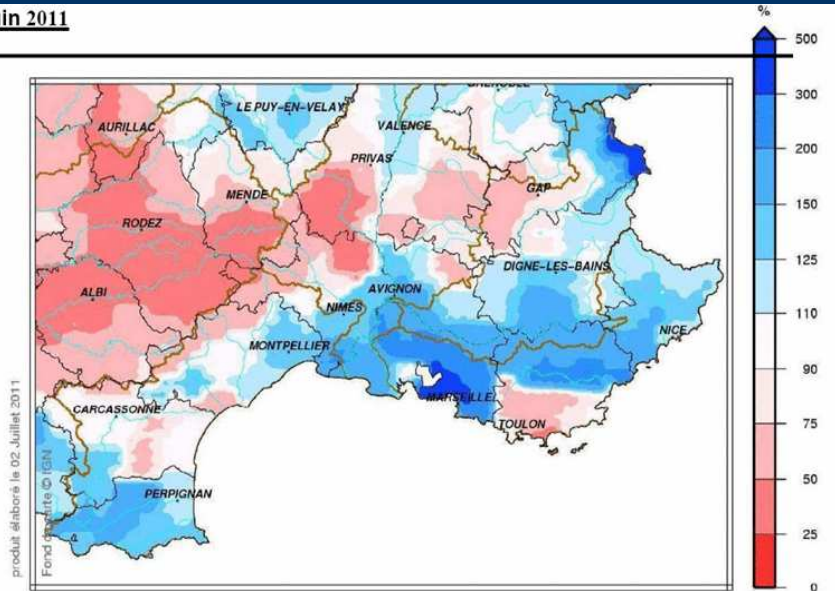
CALVI



GRI SGIONE



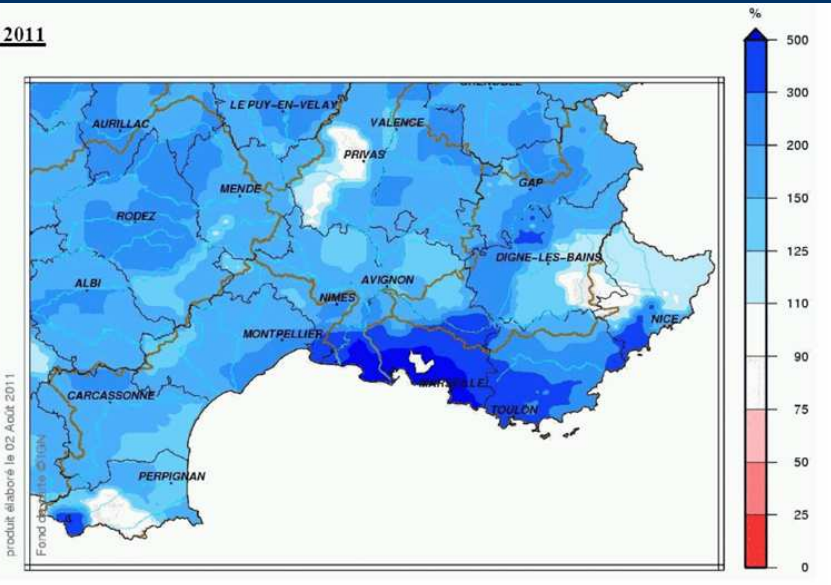
Jun 2011



produit élaboré le 02 Juillet 2011
Fond de carte © IGN

Source METEO France

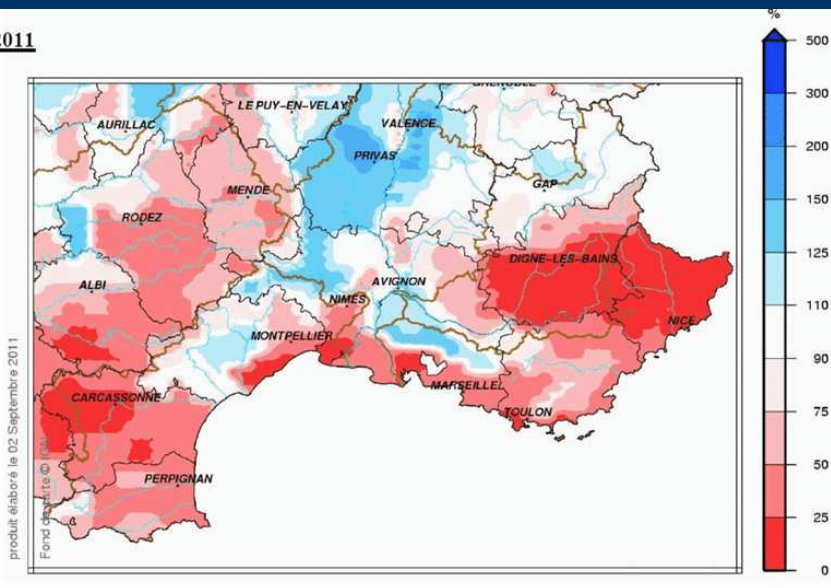
Juillet 2011



produit élaboré le 02 Août 2011
Fond de carte © IGN

Source METEO France

Août 2011



produit élaboré le 02 Septembre 2011
Fond de carte © IGN

Source METEO France

Pluviométrie de l'été 2011

Bilan: les bases d'un réseau de surveillance de l'*Ostreopsis* ?

Les réseaux seront nécessairement adaptés aux usages et/ou aux enjeux concernés.

Leur mise en place passera sans doute par une amélioration de l'évaluation du risque, et par la détermination de la sensibilité des sites.

La surveillance par le stock macroalgal, ou par la concentration dans l'eau se justifie par l'usage concerné.

Mais dans tous les cas, il semble qu'une surveillance de base sur le stock macroalgal, en plusieurs sites sensibles du littoral pourrait servir de clignotant d'alerte pour les différents réseaux liés à l'*Ostreopsis*.

Bilan: des outils de prédiction des efflorescence d'*Ostreopsis* ?

Au stade actuel des connaissances sur les conditions environnementales propice au développement des efflorescences d'*Ostreopsis*, la modélisation et l'outil satellitaire demeurent à développer:

- **par l'amélioration des performances de ces outils dans la bande très côtière, qui est le lieu d'implantation de l'*Ostreopsis*: *actuellement, les données fournies sont issues d'extrapolations de données acquises ou calculées plus au large, en raison des interférences avec la frange continentale.***
- **par l'amélioration de l'estimation sur sites des stocks d'*Ostreopsis* macroalgal, de façon à évaluer les « réservoirs à *Ostreopsis* » qui seront à la base de la modélisation du passage en phase planctonique en fonction des prévisions météorologiques.**

Dispositif de vigilance phycotoxines. Bilan 2010-2011

Nadine Neaud-Masson
Ifremer, Nantes



Dispositif de vigilance phycotoxines Bilan 2010-2011

Nadine Masson-Neaud
Coordination REPHY
Ifremer / Nantes

Rappel

- Depuis le 1^{er} janvier 2010 :

Surveillance des toxines lipophiles par analyse chimique (CL-SM/SM) à la place des bio essais sur souris.

- Pour répondre aux exigences de la Commission Européenne :

Système de vigilance : suivi systématique par Bio essais sur souris & analyse chimique toute l'année sur des lieux de référence déterminés par le Comité de Vigilance (Anses, DGS, DGAL, Ifremer).

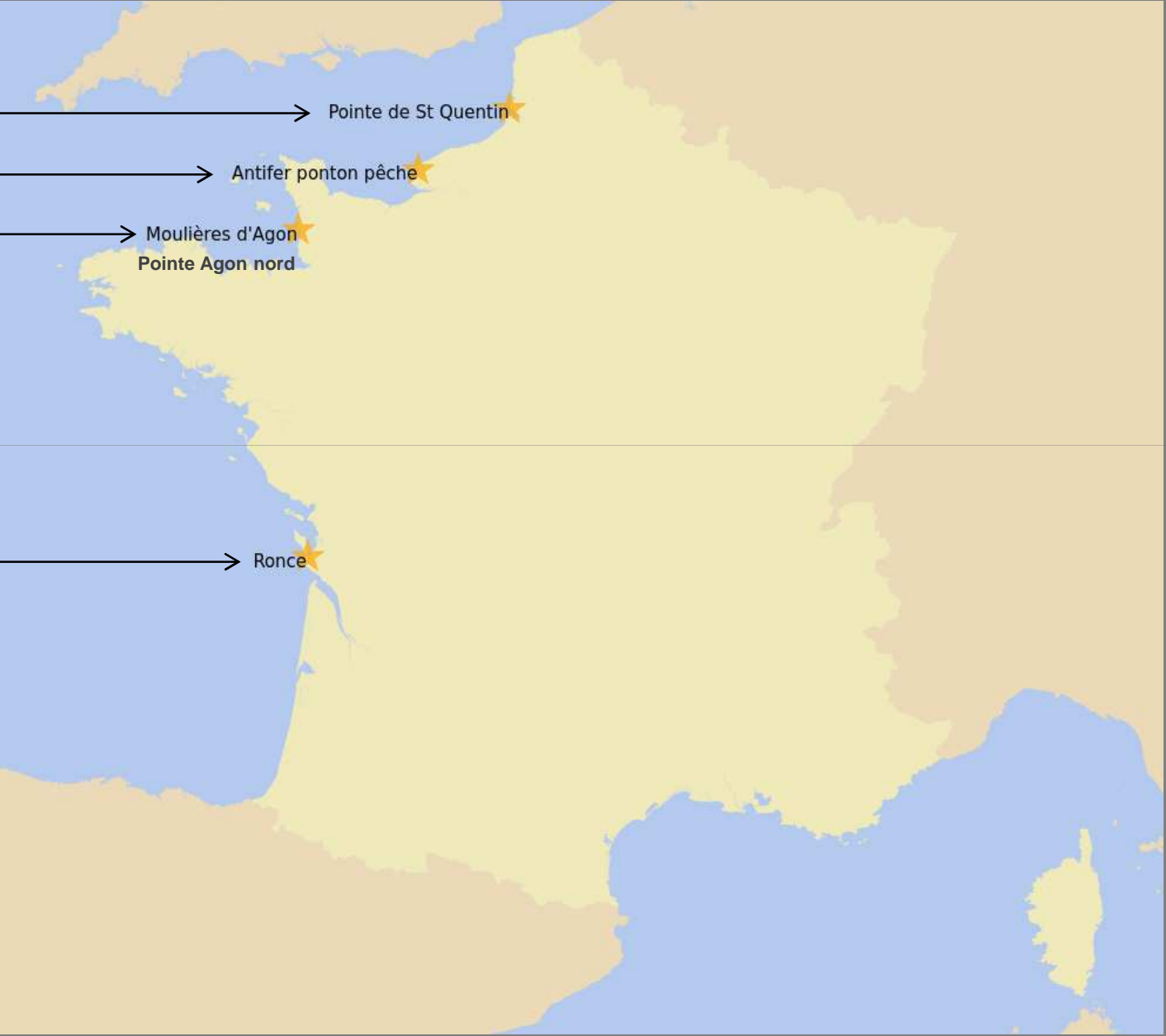
Protocole « Vigilance »

- **Échantillonnés une fois par mois toute l'année**
 - bio-essais + analyses CL-SM/SM (chair totale et glande digestive)
Les coquillages échantillonnés sont en priorité les moules
- **Critères de choix des points**
 - dans des zones de production de coquillages actives toute l'année
 - résultats de bio essais suspects ou non expliqués à plusieurs reprises pour la moitié des points choisis
 - dans des zones non à risque pour détection éventuelle de toxines déjà répertoriées ou non en France
 - répartition homogène le long du littoral

7 Lieux choisis pour avoir connu des discordances (BE+, AC-)



Autres Lieux choisis

- 
- Choix géographique → Pointe de St Quentin
- Max. *Dinophysis* 2009 → Antifer ponton pêche
- Choix géographique → Moulières d'Agon
Double lieu pour pallier à l'indisponibilité de moules
Pointe Agon nord
- Choix géographique → Ronce
+ 1 discordance en 2004

Carte des 11 lieux « VIGILANCE » 2010 et 2011



Groupes des toxines lipophiles recherchées par analyse chimique

réglementées :

AO : groupe acide okadaïque (AO, DTX1, DTX2, DTX3),
+ groupe pectenotoxine (PTX1, PTX2),

AZA : groupe azaspiracide (AZA1, AZA2, AZA3),

YTX : groupe yessotoxine (YTX, Homo-YTX, 45-OH-YTX, Homo-45-OH-YTX).

non réglementées :

groupe gymnodimine (GYMs),

groupe spirolide (SPXs),

groupe pecténotoxine (PTX2_{sa}, PTX2_{sa} épimère, PTX6)

groupe pinnatoxine (PnTXs) *SI TEMPS SURVIE SOURIS COURTS*

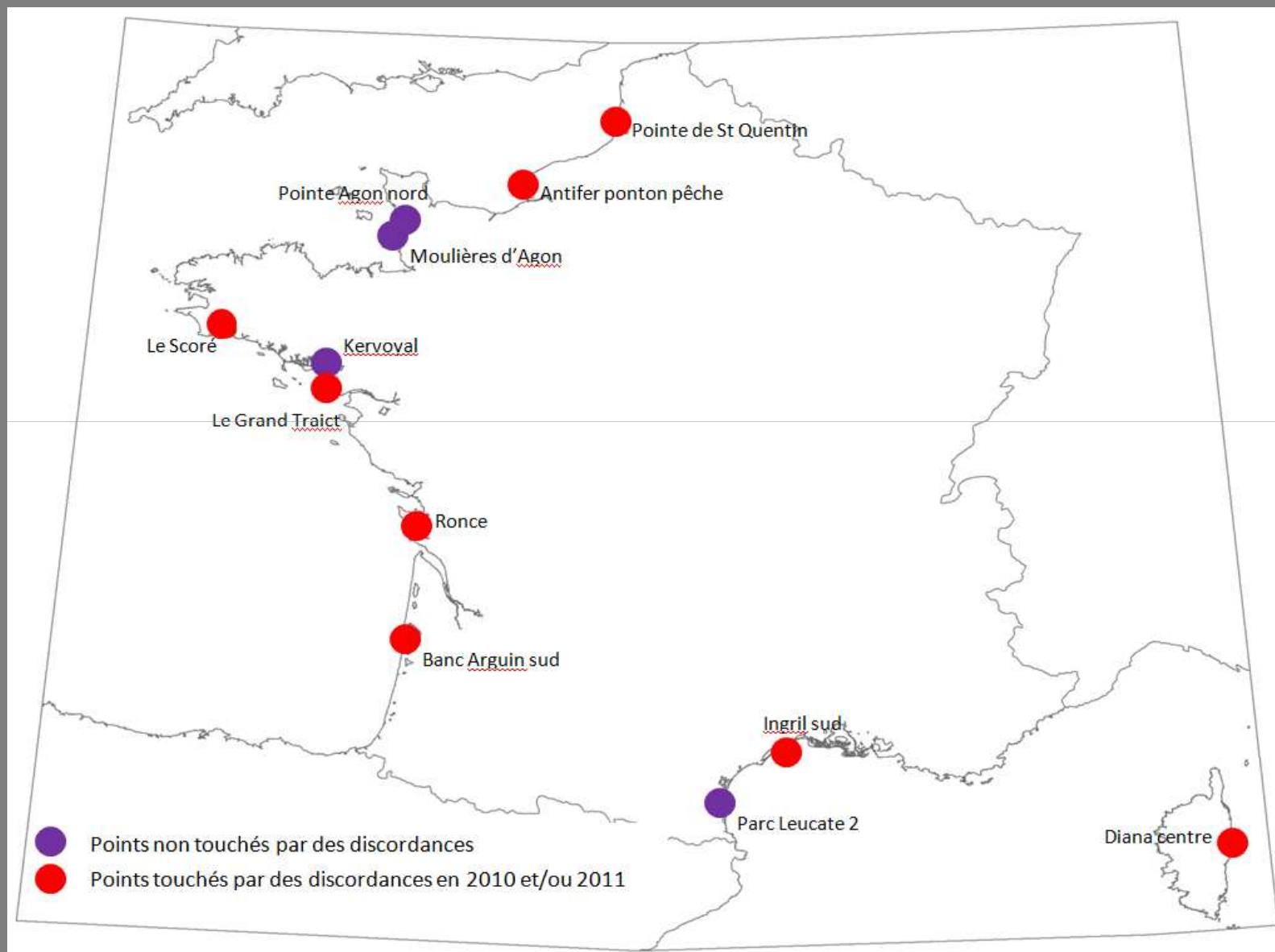
Bilan 2010

| Lieu | Coquillage | Nb BE | BE-AC- | BE+AC+ | BE+AC- | BE-AC+ |
|-----------------------------------|----------------|------------|------------|-----------|----------|----------|
| Pte St Quentin | <i>moules</i> | 10 | 10 | | | |
| Antifer ponton pêche | <i>moules</i> | 12 | 11 | 1 | | |
| Pte Agon nord / Moulières Agon | <i>moules</i> | 10 | 10 | | | |
| Le Scoré | <i>moules</i> | 11 | 7 | 4 | | |
| Kervoyal | <i>moules</i> | 12 | 10 | 2 | | |
| Grand Traict | <i>moules</i> | 13 | 10 | 2 | 1 | |
| Ronce | <i>huîtres</i> | 12 | 12 | | | |
| Banc Arguin sud | <i>moules</i> | 12 | 9 | 1 | 2 | |
| Banc Arguin sud | <i>huîtres</i> | 12 | 9 | | 3 | |
| Parc Leucate | <i>moules</i> | 10 | 10 | | | |
| Parc Leucate | <i>huîtres</i> | 12 | 12 | | | |
| Ingril sud | <i>moules</i> | 0 | | | | |
| Diana centre | <i>moules</i> | 8 | 7 | | 1 | |
| Totaux | | 134 | 117 | 10 | 7 | 0 |

Bilan 2011

| Lieu | Coquillage | Nb BE | BE-AC- | BE+AC+ | BE+AC- | BE-AC+ |
|-----------------------------------|----------------|------------|------------|----------|-----------|--------|
| Pte St Quentin | <i>moules</i> | 16 | 12 | | 4 | |
| Antifer ponton pêche | <i>moules</i> | 12 | 9 | 2 | 1 | |
| Pte Agon nord / Moulières Agon | <i>moules</i> | 13 | 13 | | | |
| Le Scoré | <i>moules</i> | 12 | 7 | 2 | 3 | |
| Kervoyal | <i>moules</i> | 12 | 11 | 1 | | |
| Grand Traict | <i>moules</i> | 12 | 11 | | 1 | |
| Ronce | <i>huîtres</i> | 15 | 12 | | 3 | |
| Banc Arguin sud | <i>moules</i> | 12 | 9 | 2 | 1 | |
| Banc Arguin sud | <i>huîtres</i> | 12 | 12 | | | |
| Parc Leucate | <i>moules</i> | 2 | 2 | | | |
| Parc Leucate | <i>huîtres</i> | 11 | 11 | | | |
| Ingril sud | <i>moules</i> | 13 | 3 | | 10 | |
| Diana centre | <i>moules</i> | 11 | 11 | | | |
| Totaux | | 153 | 123 | 7 | 23 | |

Discordances BE+ AC- en 2010 et/ou 2011



Détail discordances BE+ AC- (2010)

| Lieu | coqu. | date | Bio-essai sur souris (temps survie médian en minute) | Analyse CL-SM sur glande digestive (µg/kg) | | | Analyse CL-SM Toxines non réglementées sur glande digestive (µg/kg) |
|------------------------|----------------|-------------------|--|--|-----|-----|--|
| | | | | AO | AZA | YTX | |
| Le Grand traict | <i>Moules</i> | 17/05/2010 | 850 | 87 | n | n | n |
| Banc Arguin sud | <i>Huîtres</i> | 17/05/2010 | 877 | 137 | n | n | PTX-sa : 12 |
| | <i>Huîtres</i> | 14/06/2010 | 846 | n | n | n | PTX-sa : 16 |
| | <i>Moules</i> | 14/06/2010 | 842 | 58 | n | n | PTX-sa : 72 |
| | <i>Huîtres</i> | 19/07/2010 | 912 | n | n | n | n |
| | <i>Moules</i> | 09/08/2010 | 787 | 28 | n | n | PTX-sa : 18 |
| Diana centre | <i>Moules</i> | 11/01/2010 | 822 | 86 | n | n | PTX-sa : 41 |

n = <LD ou <LQ

Détail discordances BE+ AC- (2011)

| Lieu | Coq. | date | Bio-essai | Analyse CL-SM sur glande digestive | | | Analyse CL-SM Toxines non réglementées sur glande digestive (µg/kg) |
|-------------------------|----------------|-------------------|-----------|---------------------------------------|-----|------------|--|
| | | | | AO | AZA | YTX | |
| Pointe de St Quentin | <i>Moules</i> | 21/03/2011 | 882 | n | n | n | n |
| | | 04/04/2011 | 862 | n | n | n | n |
| | | 04/04/2011 | 1311 | n | n | n | n |
| | | 03/05/2011 | 1256 | n | n | n | n |
| Antifer ponton pêche | <i>Moules</i> | 25/10/2011 | 1226 | 145 | n | n | n |
| Le Scoré | <i>Moules</i> | 04/07/2011 | 881 | 140 | n | 18 | n |
| | | 01/08/2011 | 1288 | 39 | n | 10 | PTX-2sa : 9 SPX-desMe-C : 11 |
| | | 14/09/2011 | 1412 | 34 | n | 10 | n |
| Le Grand traict | <i>Moules</i> | 03/05/2011 | 1020 | 128 | n | n | n |
| Ronce | <i>Huîtres</i> | 14/06/2011 | 274 | n | n | n | n |
| | | 20/06/2011 | 891 | n | n | n | n |
| | | 10/10/2011 | 822 | n | n | n | n |
| Banc Arguin sud | <i>Moules</i> | 06/06/2011 | 874 | 115 | n | 120 | n |

Détail discordances BE+ AC- (2011 suite)

| Lieu | Coq. | date | Bio-essai | Analyse CL-SM sur glande digestive | | | Analyse CL-SM Toxines non réglementées sur glande digestive | |
|------------|--------|------------|-----------|---------------------------------------|-----|-----|---|------------------------|
| | | | | AO | AZA | YTX | PTX-2sa (µg/kg) | PnTX-G (µg/g de GD) |
| Ingril sud | Moules | 06/06/2011 | 17 | 113 | n | n | 9 | 2,07 |
| | | 04/07/2011 | 67 | 18 | n | 18 | n | 0,57 |
| | | 01/08/2011 | 34 | 10 | n | 14 | n | 1,12 |
| | | 31/08/2011 | 79 | 10 | n | 12 | n | 1,24 |
| | | 13/09/2011 | 74 | 12 | n | 20 | n | 1,43 |
| | | 27/09/2011 | 13 | 10 | n | 21 | n | 1,46 |
| | | 12/10/2011 | 4 | 19 | n | 14 | n | 1,98 |
| | | 25/10/2011 | 27 | 16 | n | 19 | 12 | 0,66 |
| | | 07/11/2011 | 21 | 30 | n | n | 38 | 0,66 |
| | | 05/12/2011 | 30 | 78 | n | n | 19 | 0,76 |

pinnaoxines DL50 : 0,2 µg/g GD

Bilan

- 5 discordances, (temps de survie des souris longs), pourraient être expliquées par des teneurs en toxines réglementées proches du seuil
- 10 discordances observées à Ingril (temps de survie des souris courts) s'expliquent par la présence de pinnatoxines (DL50 : 0,2 µg/g GD)
- 15 des discordances observées (temps de survie des souris longs) ne sont pas expliquées par les toxines recherchées

Conclusion

Les résultats du système de « Vigilance »

- Continuent à mettre en évidence des discordances entre les bio-essais et les analyses chimiques des toxines recherchées
- Ont permis de détecter la présence de pinnatoxines dans les coquillages de l'étang d'Ingril.

Etude des Pinnatoxines en lien avec
l'espèce *Vulcanodinium rugosum*

Philipp Hess
Ifremer, Nantes

Étude des Pinnatoxines en lien avec l'espèce *V. rugosum*

Philipp Hess¹

V. Séchet¹, E. LeRoy¹, F. Vanel¹, F. Hervé¹, E. Abadie²,

M. Geiger¹, T. LePrêtre¹, J. Molgo⁴, J. Quéré³,

N. Chomérat², E. Nézan², G. Deslanglois⁵, V. Fessard⁵, Z. Amzil¹

¹ Laboratoire Phycotoxines, IFREMER - Nantes

² Unité Littorale, IFREMER - Sète

³ Unité Dyneco, IFREMER - Plouzané

⁴ CNRS, Lab. Neurobiologie & Développement, UPR 3294-Gif sur Yvette

⁵ ANSES, Unité de toxicologie des contaminants, Fougères

2010

Échantillons de vigilance:

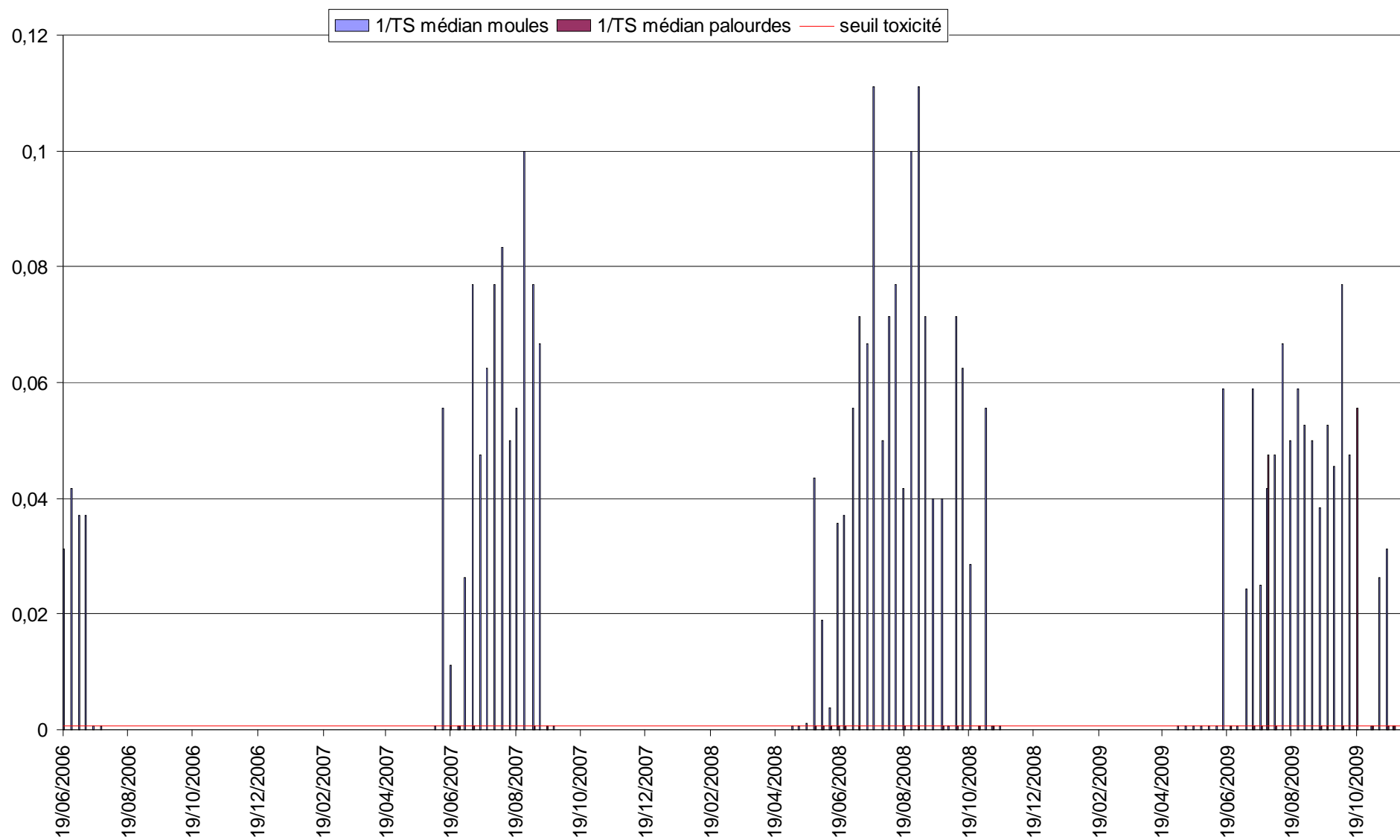
Données obtenues par l'institut
Vétérinaire Norvégien à Oslo

| Code PHYC | Date de prélèvement | Site de prélèvement | Matrice | Pin G | 13dmeSP-C |
|-----------|---------------------|----------------------------|---------|-------|-----------|
| | | | | µg/kg | µg/kg |
| 10/162 | 12/04/2010 | Banc Arguin sud | Huître | nd | 8 |
| 10/163 | 12/04/2010 | Banc Arguin sud | Moule | nd | 9 |
| 10/167 | 12/04/2010 | Le Grand traict | Moule | nd | 8 |
| 10/176 | 12/04/2010 | Kervoyal | Moule | nd | 6 |
| 10/179 | 13/04/2010 | Antifer ponton pétrolier | Moule | nd | nd |
| 10/187 | 14/04/2010 | Pointe de St Quentin | Moule | nd | nd |
| 10/190 | 14/04/2010 | Le Scoré | Moule | nd | 16 |
| 10/200 | 19/04/2010 | Ronce | Huître | nd | 9 |
| 10/203 | 19/04/2010 | Diana centre | Moule | nd | 3 |
| 10/210 | 19/04/2010 | Parc Leucate 2 | Moule | nd | nd |
| 10/211 | 19/04/2010 | Parc Leucate 2 | Huître | nd | nd |
| 10/212 | 19/04/2010 | Etang du Prévost (a) | Moule | 3 | 2 |
| 10/215 | 27/04/2010 | Pointe Agon nord | Moule | nd | nd |
| 10/238 | 05/05/2010 | Le Scoré | Moule | nd | 19 |
| 10/278 | 17/05/2010 | Banc Arguin sud | Huître | nd | 6 |
| 10/280 | 17/05/2010 | Banc Arguin sud | Moule | nd | 7 |
| 10/289 | 17/05/2010 | Kervoyal | Moule | nd | 4 |
| 10/290 | 17/05/2010 | Le Grand traict | Moule | nd | 6 |
| 10/320 | 17/05/2010 | Ronce | Huître | nd | 18 |
| 10/331 | 17/05/2010 | Diana centre | Moule | nd | 2 |
| 10/382 | 19/05/2010 | Pointe de St Quentin | Moule | nd | nd |
| 10/394 | 25/05/2010 | Parc Leucate 2 | Moule | nd | nd |
| 10/395 | 25/05/2010 | Parc Leucate 2 | Huître | nd | nd |
| 10/397 | 25/05/2010 | Antifer ponton pêche | Moule | nd | nd |
| 10/446 | 27/05/2010 | Pointe Agon nord | Moule | nd | nd |
| 10/450 | 02/06/2010 | Le Scoré | Moule | nd | 13 |
| 10/522 | 14/06/2010 | Banc Arguin sud | Moule | nd | 3 |
| 10/532 | 13/06/2010 | Le Grand traict | Moule | nd | 6 |
| 10/562 | 14/06/2010 | Diana centre | Moule | nd | 1 |
| 10/564 | 14/06/2010 | Antifer Ponton PÊche | Moule | nd | 1 |
| 10/566 | 15/06/2010 | Pointe Agon nord | Moule | nd | nd |
| 10/568 | 15/06/2010 | Ronce | Huître | nd | 5 |
| 10/569 | 14/06/2010 | Kervoyal | Moule | nd | 4 |
| 10/572 | 14/06/2010 | Parc Leucate 2 | Huître | nd | nd |
| 10/622 | 15/06/2010 | Fillières de Fleury d'Aude | Moule | nd | 2 |
| 10/733 | 01/07/2010 | Le Scoré | Moule | 3 | 10 |
| 10/740 | 12/07/2010 | Le Grand traict | Moule | nd | 5 |
| 10/784 | 05/07/2010 | Antifer ponton pêche | Moule | nd | 1 |
| 10/819 | 19/07/2010 | Etang du Prévost (a) | Moule | 7 | 14 |
| 10/820 | 19/07/2010 | Diana centre | Moule | nd | 1 |
| 10/822 | 19/07/2010 | Parc Leucate 2 | Huître | nd | nd |
| 10/823 | 19/07/2010 | Kervoyal | Moule | nd | 3 |
| 10/832 | 19/07/2010 | Banc Arguin sud | Moule | nd | 5 |

Toxicités atypiques – France 2003 – 2008 (Rapport Ifremer Belin et al., 2009)

| zone | lieu | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | Total |
|----------------------------------|-----------------------------|------|------|------|------|------|------|-------|
| Antifer | Antifer ponton pêche | | | | | 2 | 1 | 3 |
| Baie de l'Orne | baie de seine - O | | | 1 | | | | 1 |
| Courseulles - Port Bessin | baie de seine - D | 2 | | 2 | | | | 4 |
| Iroise | Basse Jaune | | 2 | 2 | | | | 4 |
| Baie de Douarnenez | Kervel | | 1 | | | 1 | | 2 |
| Baie d'Audierne | Tronoen | | | 1 | | 1 | | 2 |
| Iles de Glénan | Les Glénan | 1 | 3 | 2 | 2 | 2 | | 10 |
| Bénodet | Ile Iudy | | | | | 1 | | 1 |
| Concarneau | Le Scoré | | | | | 5 | | 5 |
| Aven, Belon et Laïta | L'Ile | 1 | 2 | | 1 | | | 4 |
| Rade de L'orient | Groix nord | | | 4 | 5 | 6 | 2 | 17 |
| Baie d'Etel | Penthièvre | | | | 1 | 10 | 2 | 13 |
| Rivière d'Etel | Beg er Vil | | | | 5 | 13 | 3 | 21 |
| Courreaux de Belle Ile | Belle-Ile | | | | 1 | 2 | | 3 |
| Baie de Quiberon | Men er Roue | | | 4 | 1 | | | 5 |
| Le Pô | Kerivor | | | | | 3 | | 3 |
| Rivière de Crach | Les Presses | | | | | 4 | | 4 |
| St Philibert-Le Brenegny | Karrec-Rouz | | | | 1 | 2 | | 3 |
| Plateau de la Recherche | Nord Artimon | | | | 1 | | | 1 |
| Rivière de Penerf | Pointe er Fosse | | | | | 3 | | 3 |
| Baie de Vilaine | | | | 3 | 3 | 9 | 5 | 20 |
| Traicts du Croisic | Le Grand traict | | | 1 | | | 1 | 2 |
| Estuaire de la Loire | Estuaire (b) | | | | 1 | 1 | | 2 |
| Baie de l'Aiguillon | La Carrelère | | | | | 1 | | 1 |
| Sud Marennes Oléron | Ronce | | 1 | | | | | 1 |
| Bassin d'Arcachon | Banc Arguin sud | 1 | 3 | 34 | 28 | 5 | 18 | 89 |
| Etang de Salses-Leucate | | 5 | 3 | 2 | 9 | 10 | 9 | 38 |
| Etangs Palavasiens | | | | | 1 | 16 | 4 | 21 |
| Rade de Toulon | | | | | | | 1 | 1 |
| Etangs de Diana - Urbino | | 1 | | | | | 2 | 3 |
| Total | | 11 | 15 | 56 | 59 | 92 | 48 | 281 |

Toxicités atypiques – France 2003 – 2008 (Rapport Ifremer Belin et al., 2009)

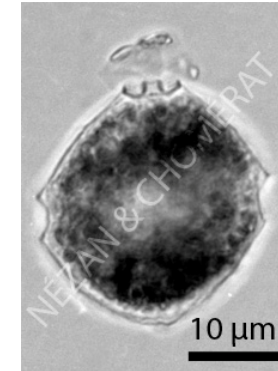
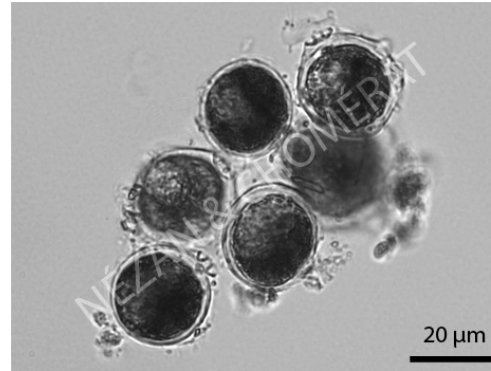


**Vulcanodinium rugosum gen. et sp. nov. (Dinophyceae),
 un nouveau dinoflagellé marin
 de la côte méditerranéenne française**

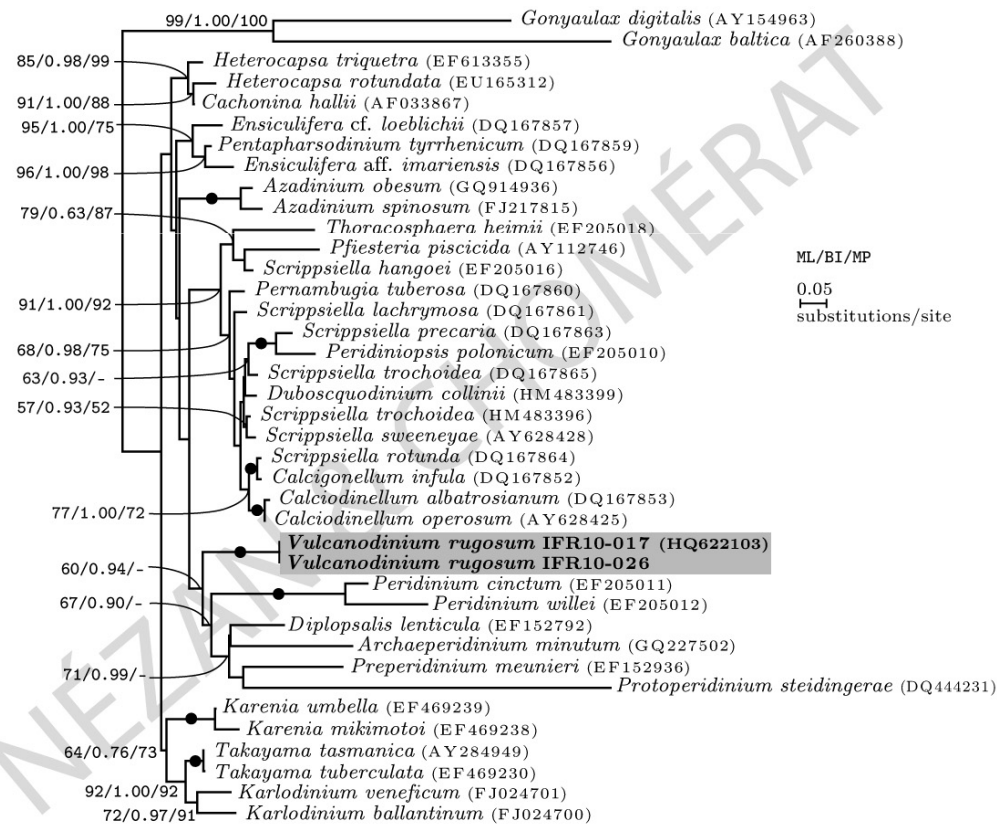
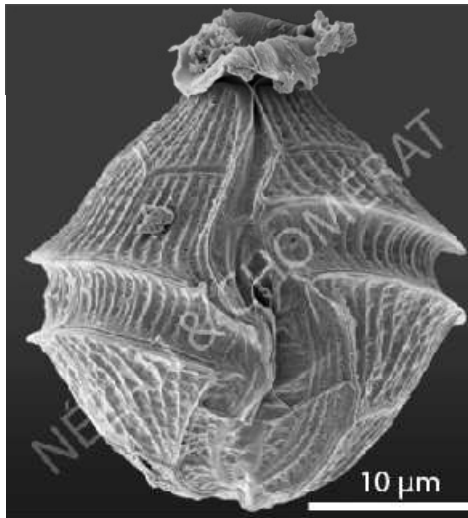
Elisabeth NÉZAN* & Nicolas CHOMÉRAT

IFREMER, Laboratoire Environnement et Ressources – Finistère Bretagne-Nord,
 13 rue de Kérose, 29187 Concarneau Cedex, France

(Reçu le 21 mai 2010, en version révisée le 18 novembre 2010,
 accepté le 26 novembre 2010)



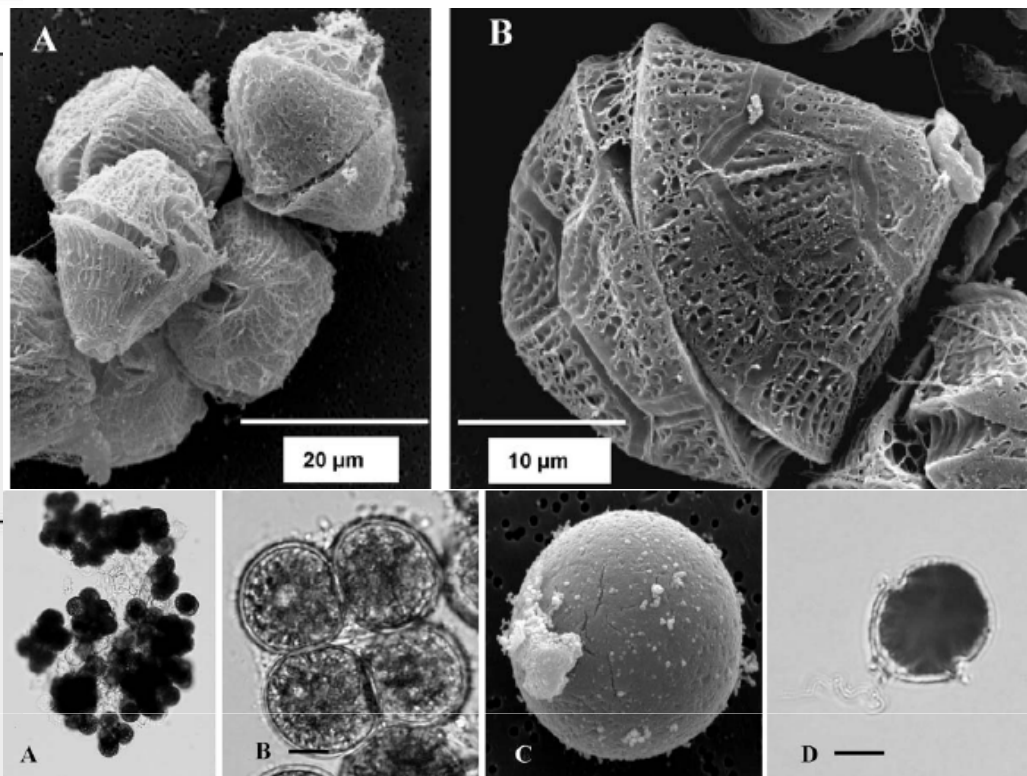
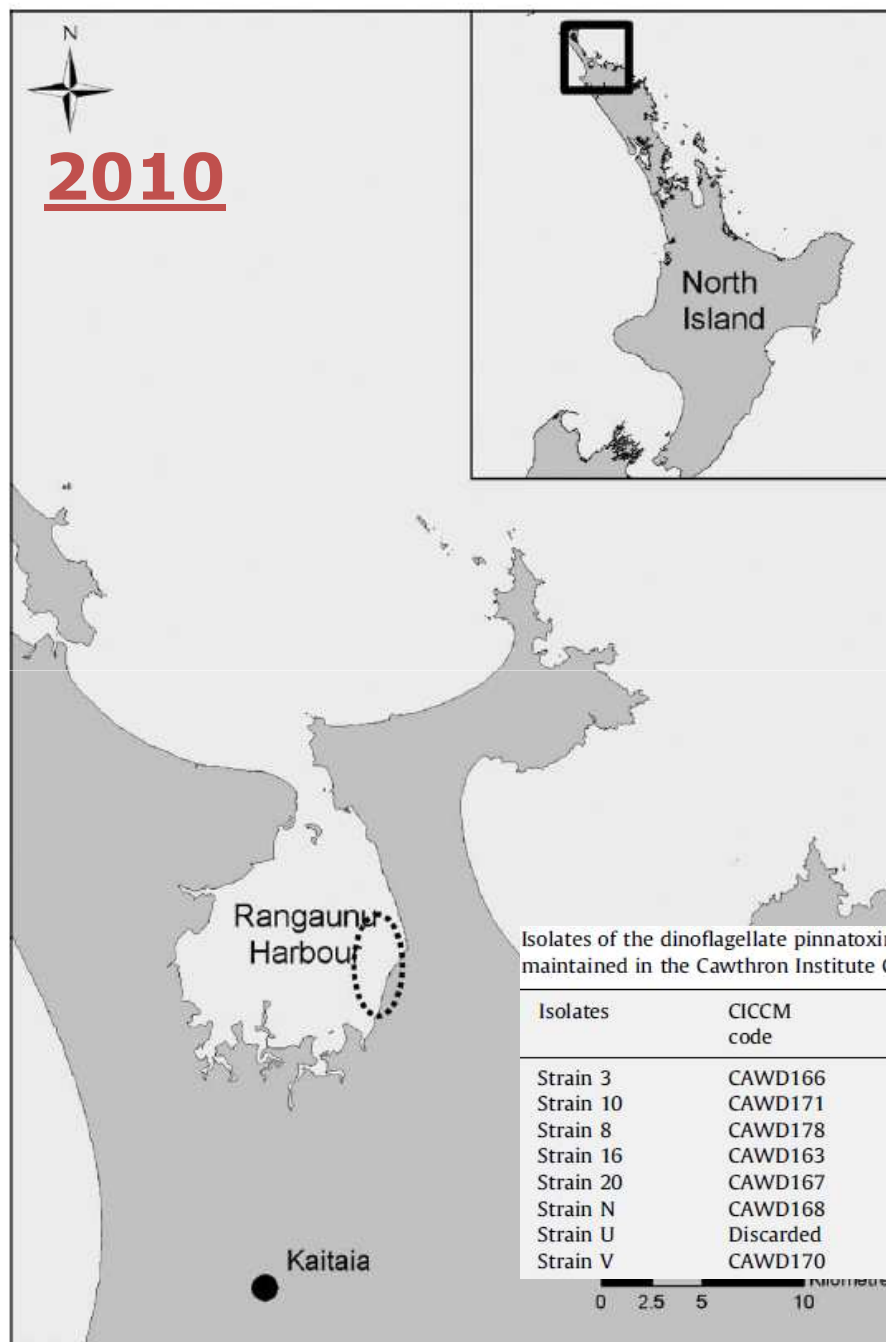
2010/11



| | |
|-------------------|----|
| GONYAULACALES | GO |
| PERIDINIALES | |
| THORACOSPHAERALES | |
| PHYTODINIALES | |
| PERIDINIALES | P |
| ? | |
| PERIDINIALES | |
| GYMNODINIALES | GY |

L'Étang d'Ingril – Lagune méditerranéenne





Isolates of the dinoflagellate pinnatotoxin producer tested for toxin production and maintained in the Cawthron Institute Culture Collection of Micro-algae (CICCM).

| Isolates | CICCM code | Pinnatotoxin E (pg cell ⁻¹) | Pinnatotoxin F (pg cell ⁻¹) |
|-----------|------------|---|---|
| Strain 3 | CAWD166 | 3.7 | 20.1 |
| Strain 10 | CAWD171 | 0.5 | 3.5 |
| Strain 8 | CAWD178 | 0.4 | 2.3 |
| Strain 16 | CAWD163 | 0.8 | 5.1 |
| Strain 20 | CAWD167 | 1.4 | 8.4 |
| Strain N | CAWD168 | 0.8 | 4.6 |
| Strain U | Discarded | 0.0 | 0.3 |
| Strain V | CAWD170 | 2.4 | 13.6 |

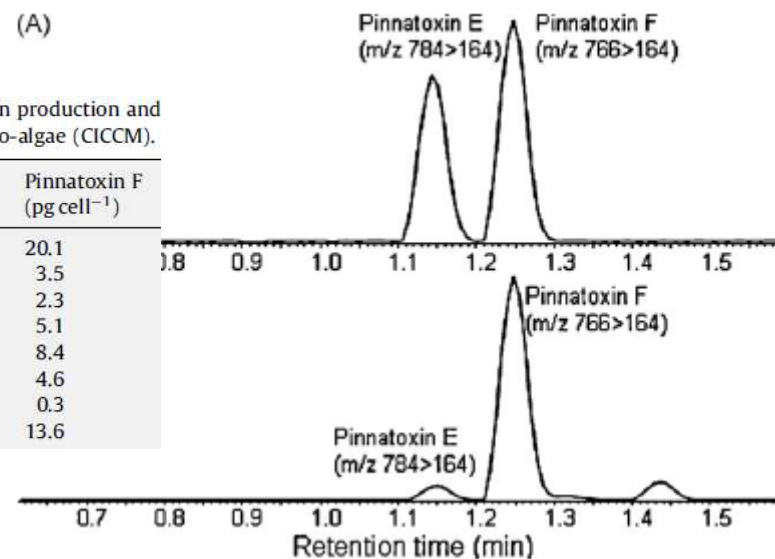


Fig. 1. Map of Rangaunu Harbour, Northland, New Zealand showing the 2009 sampling site.

Pinnatoxins, Shellfish Toxins That Cause Food Poisoning

We discovered pinnatoxins after conducting our research on halichondrins. We isolated pinnatoxins A–D (5–8) and determined their structures as Ca^{2+} channel activators from the bivalve *Pinna pectinata* (Fig. 3).²¹ There have been reports of shellfish poisoning on the coast of the Ariake Sea in Japan. Furthermore, it is known that the Chinese government has forbidden the consumption of the viscera of *Pinna attenuata*. Both of these shellfish contain a large adductor muscle, which is a popular sushi ingredient in Japan. Because it is difficult to collect a large number of *P. pectinata*, we extracted pinnatoxin A (5) from *Pinna muricata*, a shellfish that Okinawans never eat because it is considered poisonous. Pinnatoxin A (5) is a water-soluble, amphoteric compound that contains iminium and carboxylate moieties. At first impression, its structure looks like a carbocycle, but it is actually biosynthesized from a

Uemura, D. (2006). "Bioorganic studies on marine natural products - Diverse chemical structures and bioactivities." Chemical Record 6(5): 235-248.

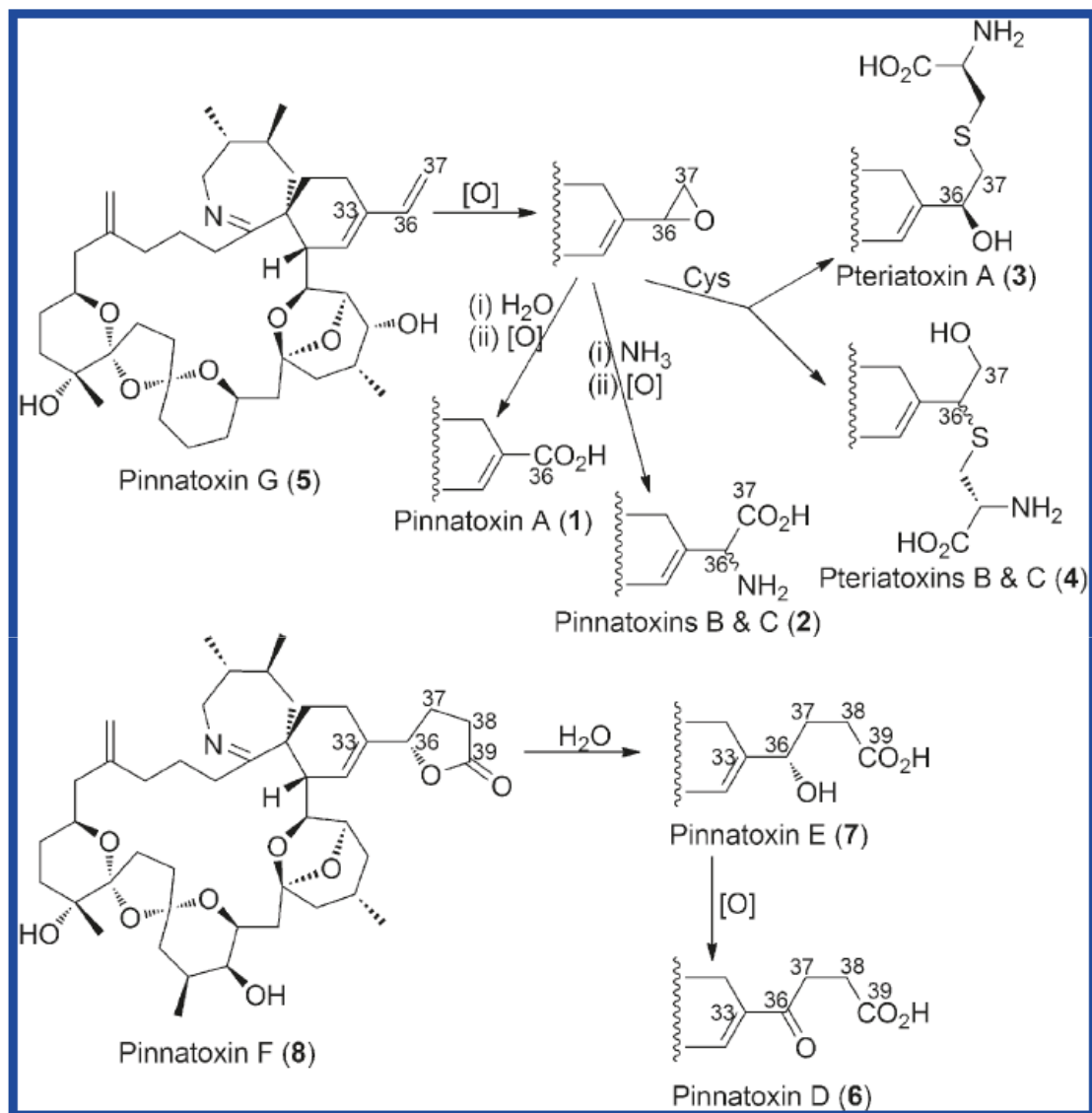
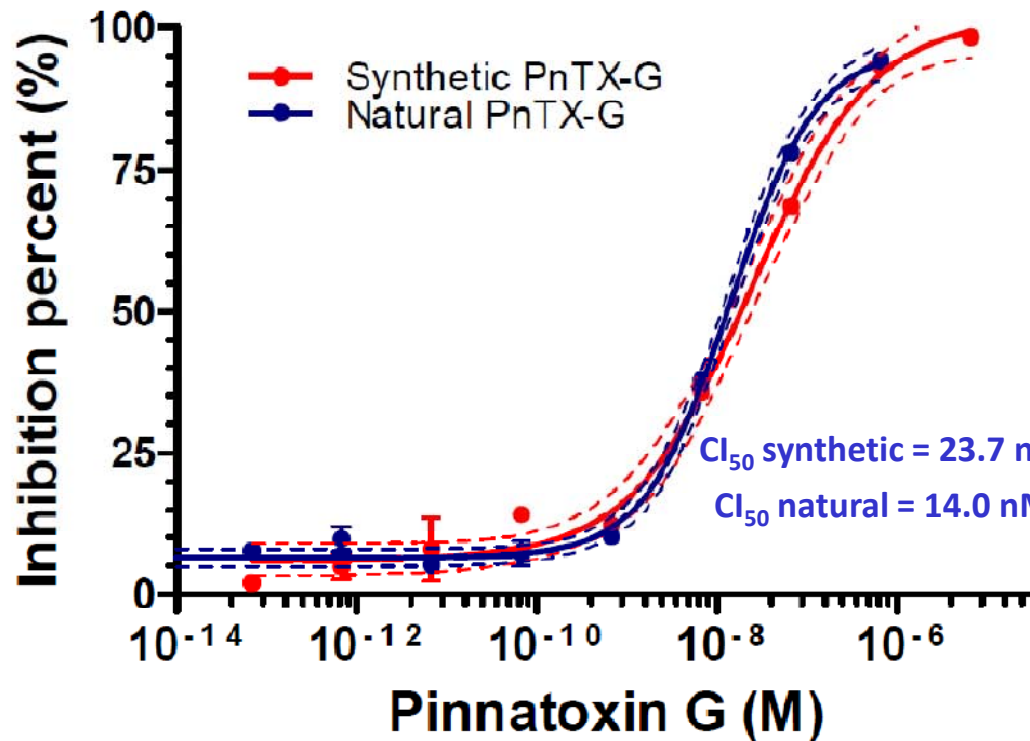
2010

Figure 5. Proposed metabolic pathway for conversion of pinnatoxins F (8) and G (5) to form the known pinnatoxins and pteriatoxins. Note that 7 and 8 are depicted with arbitrary stereochemistry at C-36.

Comparaison de la PnTX-G naturelle avec la PnTX-G de synthèse (Jordi Molgo, Romulo Araoz)



**Liaison forte au récepteur
nicotinique de l'acétyl-
cholinesterase**

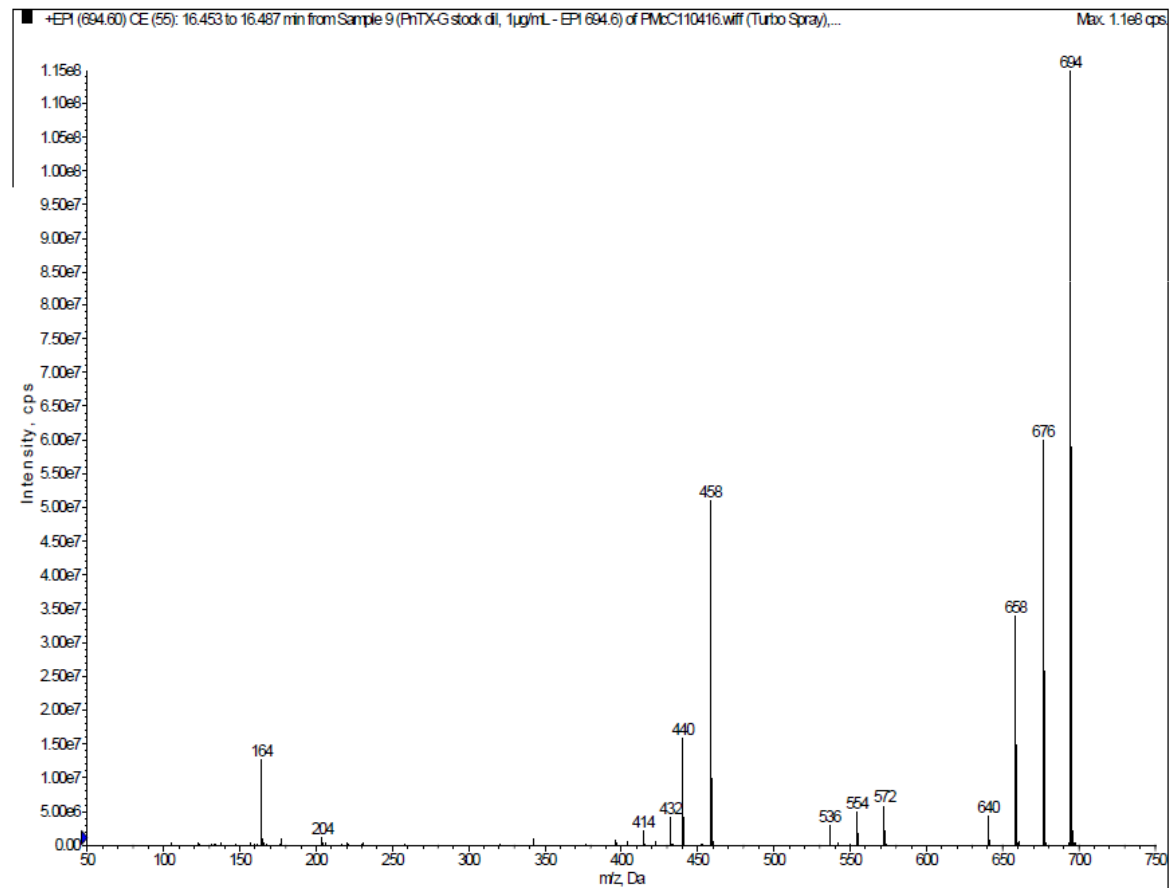


**Effet potentiel sur l'humain
par les maladies du type
Neuro-dégénératif !
(Alzheimer, Parkinson ...)**

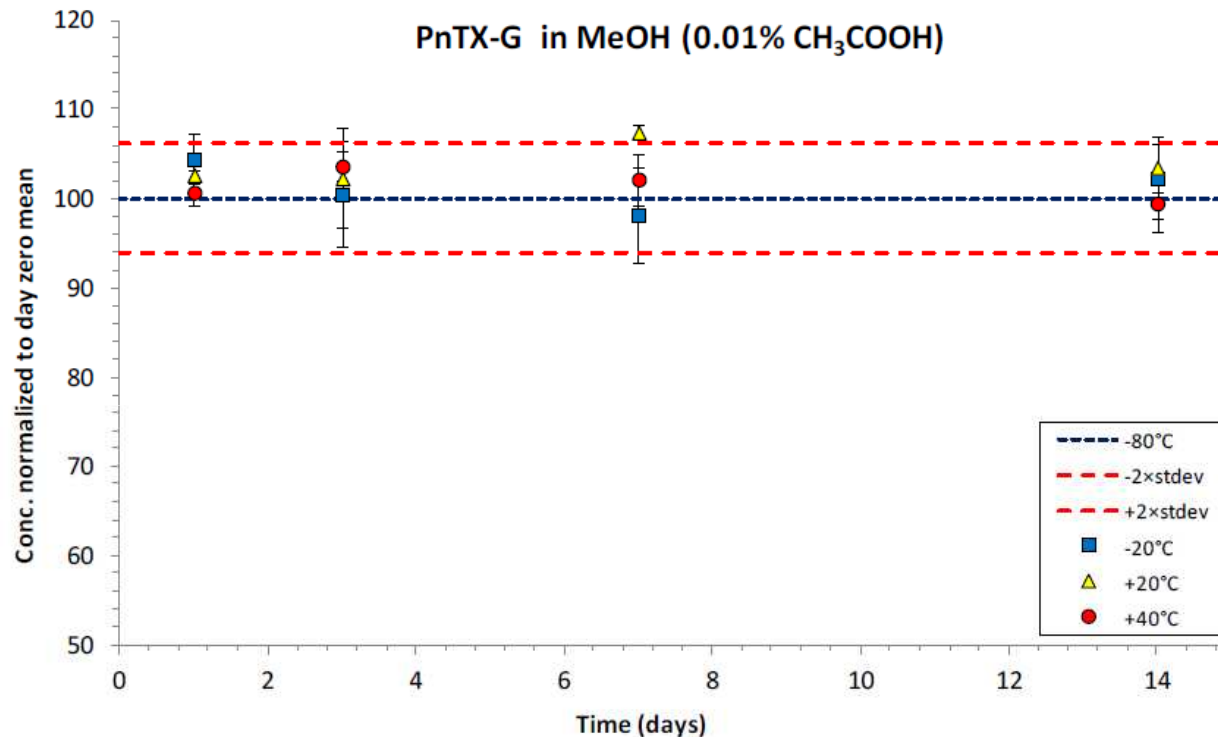
Production d'un calibrant caractérisé pour la PnTX-G Contrat Ifremer – NRCC (McCarron et al.)

1. Purity analysis and structure confirmation

The purity of the PnTX-G material obtained for preparation of the calibrant was assessed by NMR and LC-MS. No significant impurities were detected by NMR and LC-MS analysis and the material was deemed adequate for production of a calibrant RM. The NMR also confirmed the identity of the toxin and an enhanced product ion spectrum acquired on the stock solution was characteristic of PnTX-G (Figure 2).

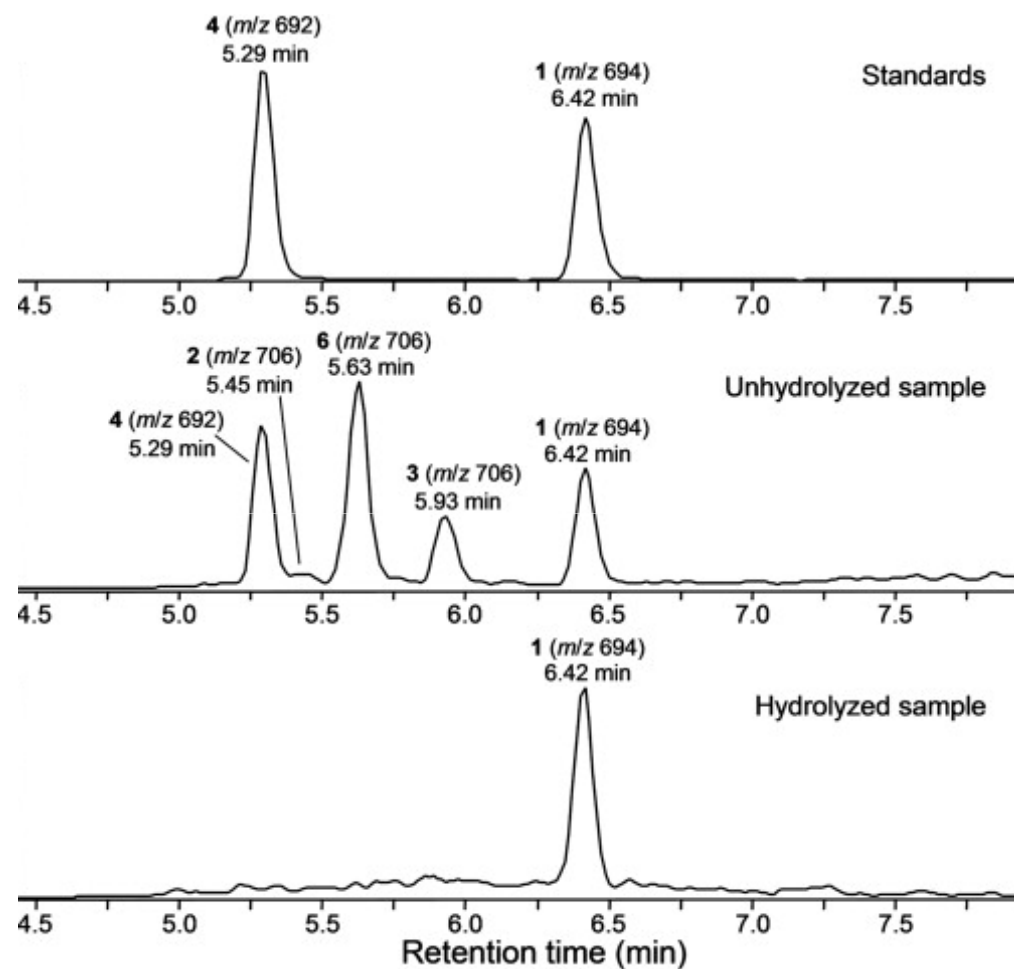


Production d'un calibrant caractérisé pour la PnTX-G Contrat Ifremer – NRCC (McCarron et al.)



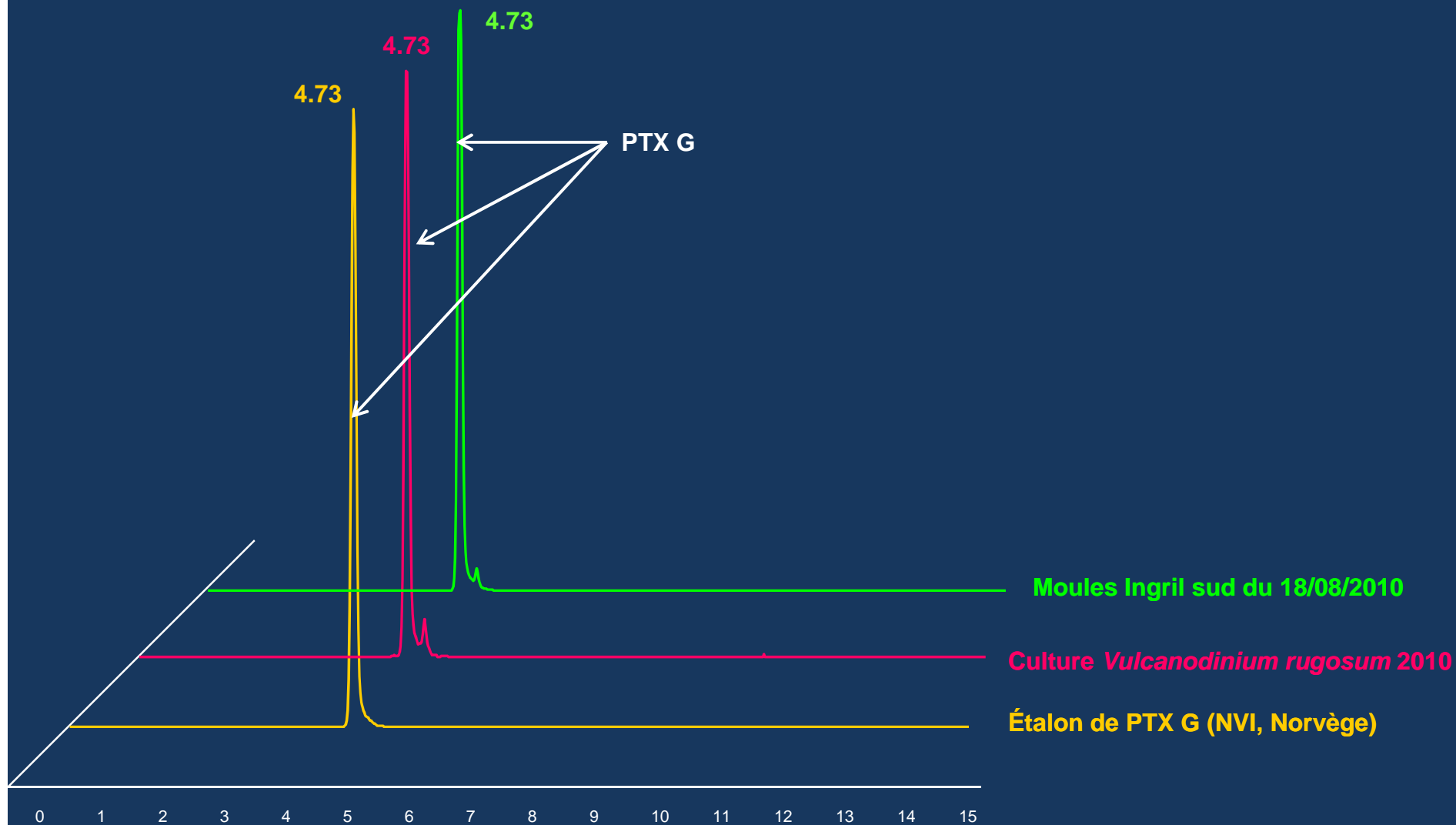
- Stockage durant 14 j à 40°C avec de l'acide faible (acétique) ne dégrade pas la toxine !
- Toxine susceptible de survivre aux conditions de la digestion chez l'être humain !!

PnTX-G est stable à travers l'hydrolyse alcaline

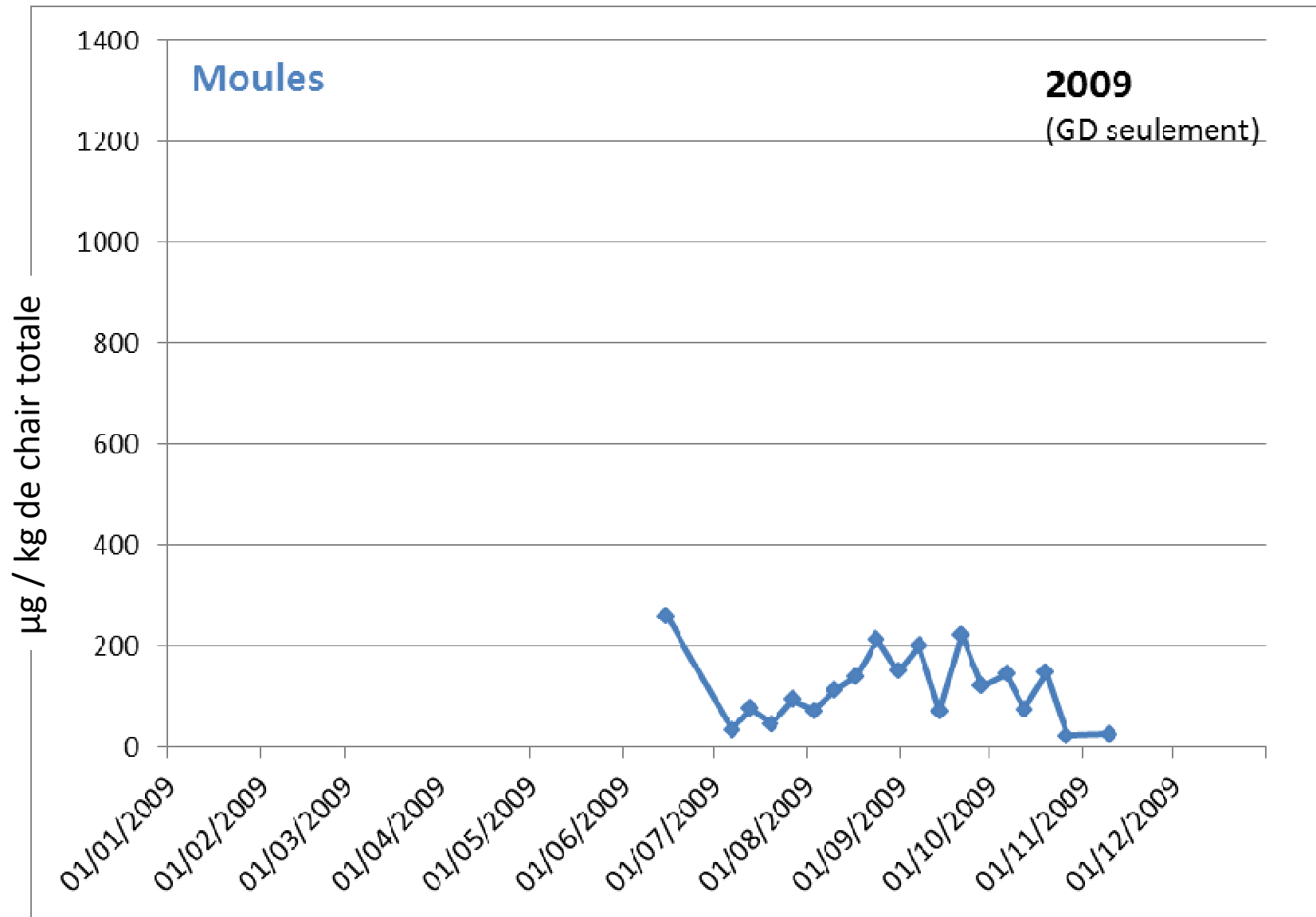


→ Toxine stable dans les conditions plus sévères que dans l'intestin !!

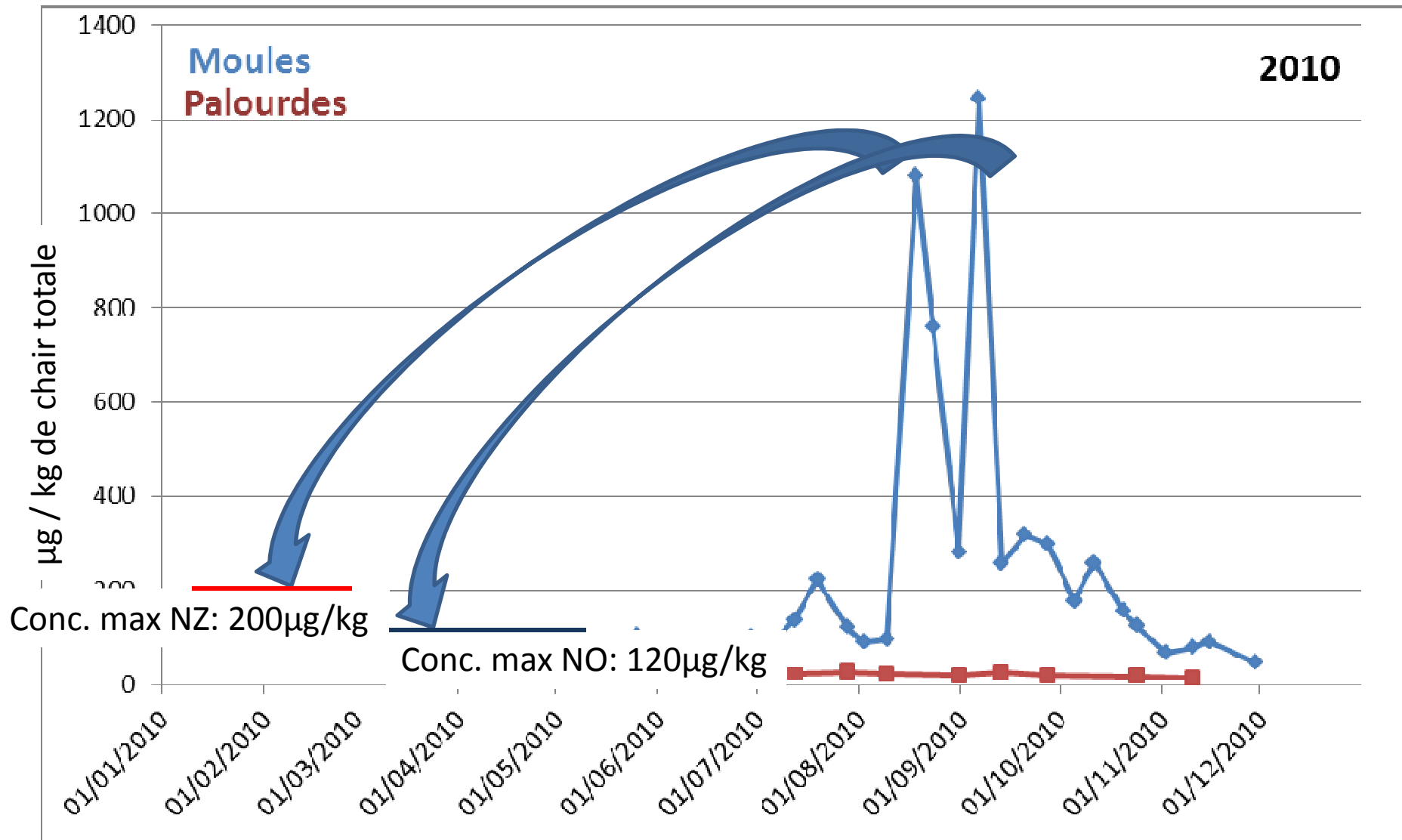
Analyses de *V. rugosum*, étalon secondaire et échantillon de moule de l'Etang d'Ingril



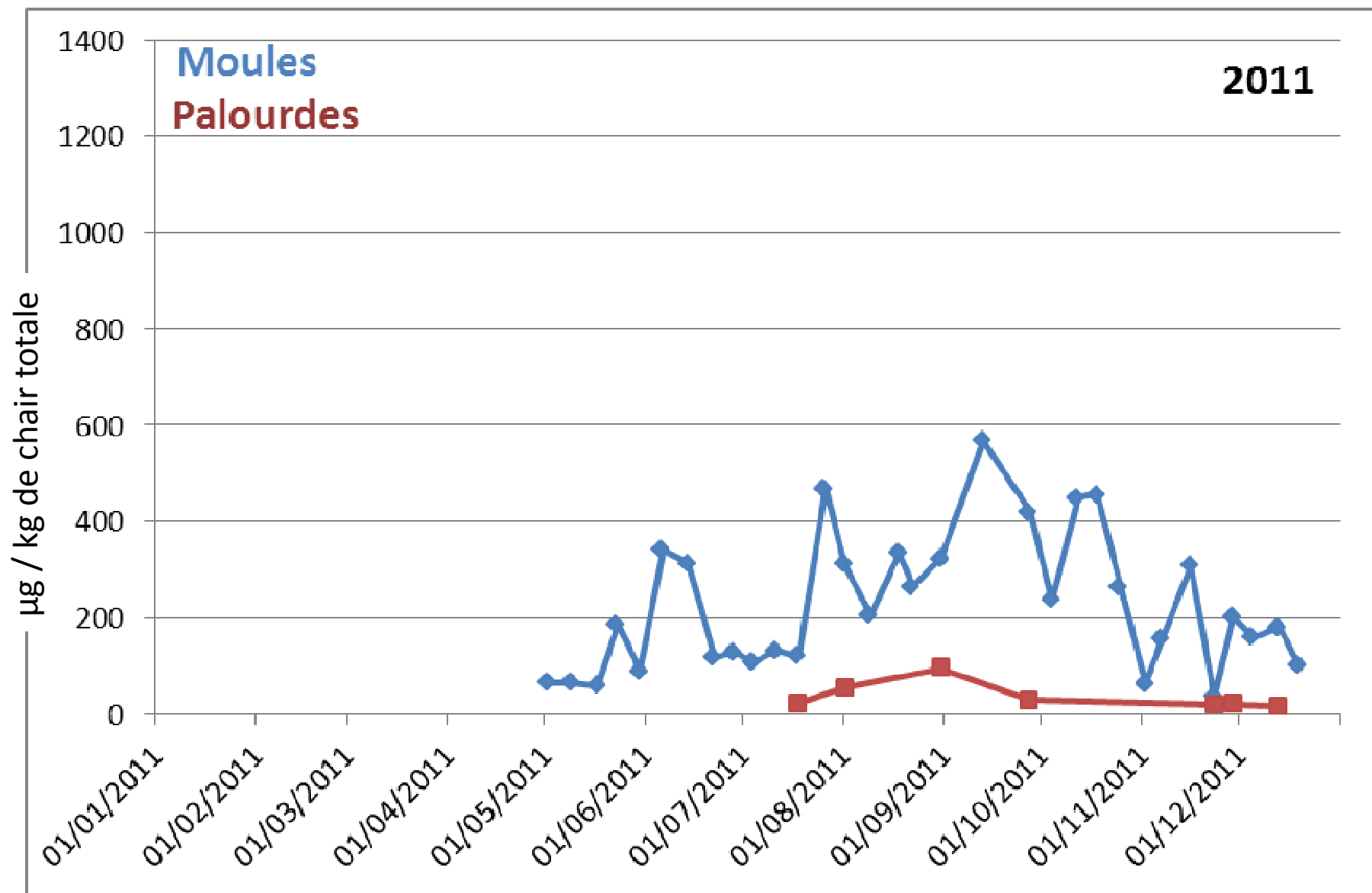
Ingril 2009 – ré-analysé en 2012



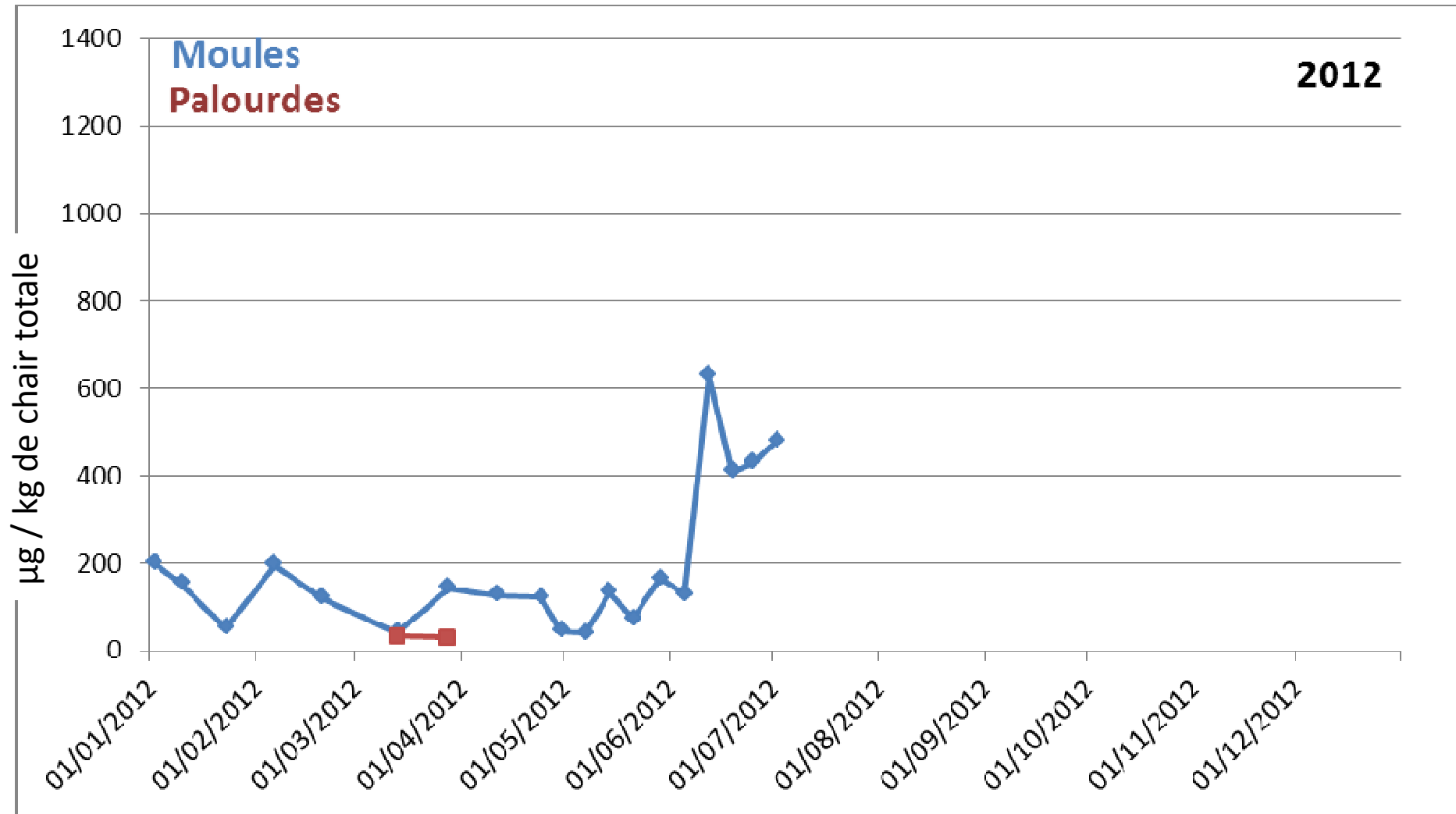
Ingril 2010 – ré-analysé en 2012



Ingril 2011



Ingril 2012

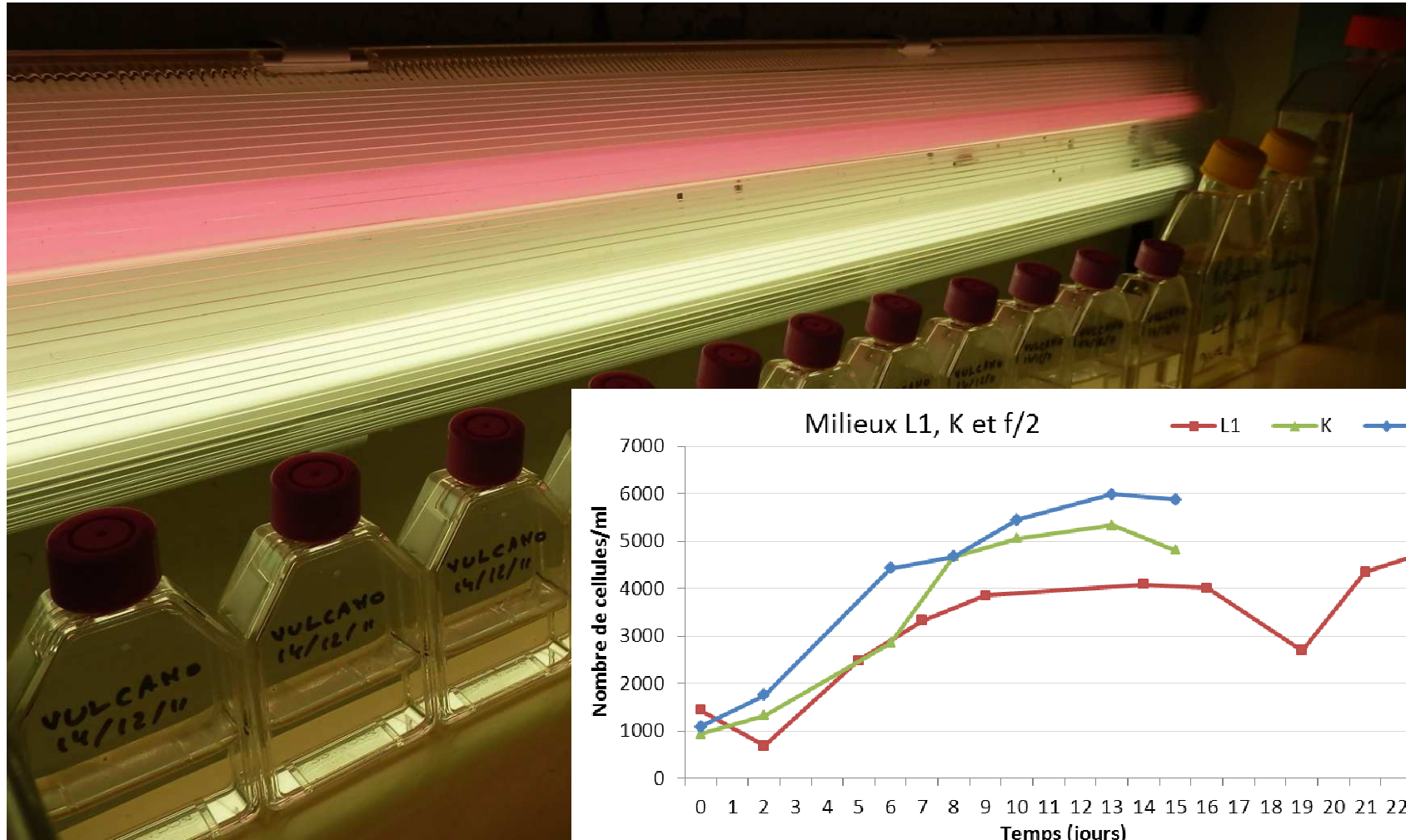


Comparaisons des niveaux de contamination entre moules et palourdes, ainsi qu'entre les ratios des pinnatoxines G et A dans moules et dans les palourdes

| | PnTX-G palourdes | PnTX-G moules | ratio PnTX G moules/ palourdes | palourdes | moules |
|------------------|---------------------|------------------|--------------------------------------|-----------------------|--------|
| date prélèvement | µg/kg CT | µg/kg CT | | Ratio PnTXA/PnTXG (%) | |
| 18/07/2011 | 23 | 121 | 5 | 2,1 | 0,9 |
| 01/08/2011 | 55 | 459 | 8 | 2,2 | 0,8 |
| 31/08/2011 | 95 | 324 | 3 | 1,2 | 0,6 |
| 27/09/2011 | 28 | 421 | 15 | 2,0 | 0,5 |
| 23/11/2011 | 19 | 37 | 2 | s/o | 3,7 |
| 29/11/2011 | 21 | 202 | 10 | s/o | 0,8 |
| 13/12/2011 | 17 | 181 | 11 | s/o | 0,6 |
| 13/03/2012 | 35 | 43 | 1 | s/o | s/o |
| 28/03/2012 | 32 | 145 | 5 | s/o | s/o |
| | | moyenne | 7 | 1,89 | 1,13 |
| | | CV (%) | 68 | 25 | 100 |

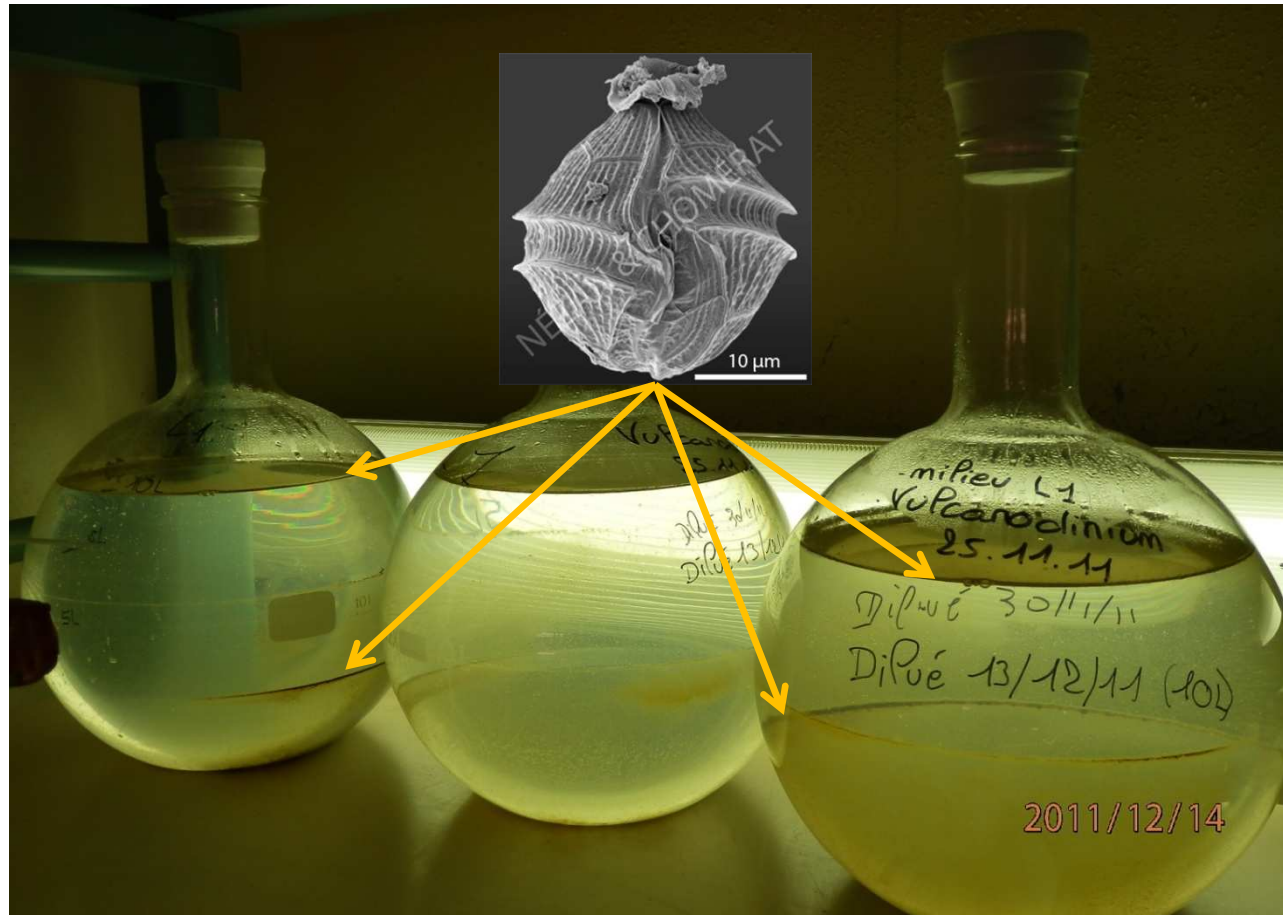
A Ingril PnTX-G prévalent et PnTX-A analogue mineur

Paramètres environnementaux pour *V. rugosum* - suivi de la courbe de croissance



Culture de *V. rugosum*

- faisabilité d'une production en masse



Organisme accroche aux parois des flacons de culture → semibenthique ?

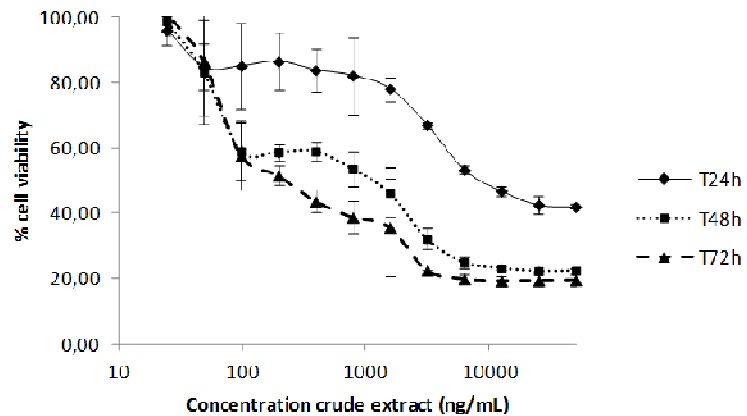
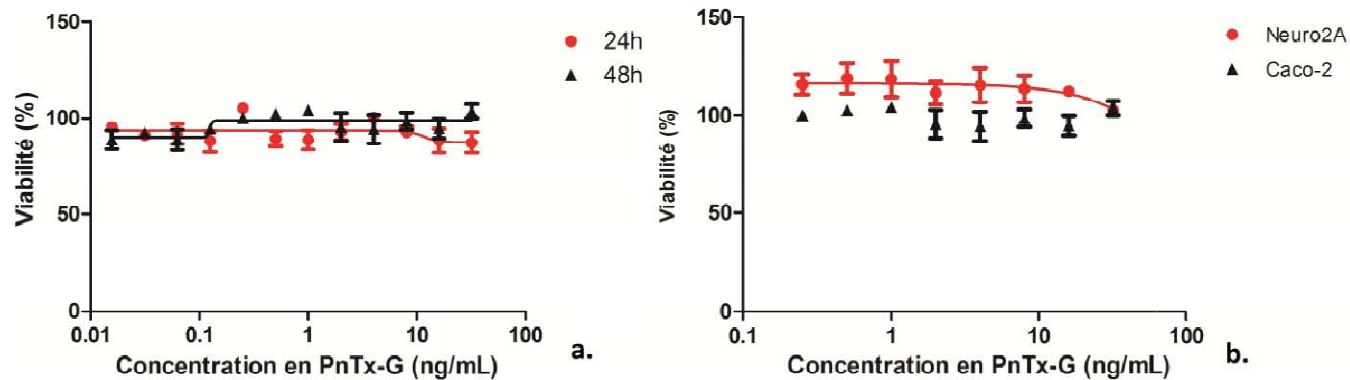
Culture de *V. rugosum*

- faisabilité d'une production en masse



- Production lente due aux caractéristiques de l'organisme
- 350 Litres de cultures sur 4 mois ont donnée 290 g de pâte d'algue

Évaluation de la cytotoxicité: PnTX & extrait brut



Données de toxicité ip – imines cycliques

Table 7: Acute toxicity of GYMs, PnTXs and PtTXs after intraperitoneal (*i.p.*) injection in mice (modified and updated from Munday, 2008).

| Compound | Dose (µg/kg b.w.) | Parameter | Reference |
|------------------------------|-------------------|--------------------|------------------------|
| GYM A (crude extract) | 450 | LD ₅₀ | Seki et al. (1995) |
| GYM A (crude extract) | 700 | MLD | Stewart et al. (1997) |
| GYM A (> 95 % pure) | 96 (CI 79-118) | LD ₅₀ | Munday et al. (2004) |
| GYM A | 80 | LD ₅₀ | Kharrat et al. (2008) |
| GYM B | 800 | LD ₅₀ | Kharrat et al. (2008) |
| (+)-PnTX A | 135 | LD ₉₉ | Uemura et al. (1995) |
| (+)-PnTX A | 180 | LD ₉₉ | McCauley et al. (1998) |
| (-)-PnTX A (synthetic) | 5000 | no effect observed | McCauley et al. (1998) |
| PnTXs B and C ^(a) | 22 | LD ₉₉ | Takada et al. (2001a) |
| PnTX D | 400 | LD ₉₉ | Chou et al. (1996a) |
| PnTX E | 45 (CI 32-58) | LD ₅₀ | Selwood et al. (2010) |
| PnTX F | 16 | LD ₅₀ | Selwood et al. (2010) |
| PnTXs E and F ^(b) | 13 (CI 12.5-15.8) | LD ₅₀ | Rhodes et al. (2010) |
| PnTX G | 50 (CI 35-66) | LD ₅₀ | Selwood et al. (2010) |
| PtTX A | 100 | LD ₉₉ | Takada et al. (2001b) |
| PtTX B and C ^(a) | 8 | LD ₉₉ | Takada et al. (2001b) |

CI: 95 % confidence interval; MLD: minimum lethal dose; (+) and (-) refer to stereoisomers of PnTX A molecule; (a): 1:1 mixture of B and C; (b): Estimated from the LD₅₀ of algal extract containing approximately 10 µg PnTX/mg (Rhodes et al., 2010).

Données de toxicité orale – pinnatoxines

Table 2

Median lethal doses of pinnatoxins E, F and G by gavage.

| Compound | State of alimentation | LD ₅₀ (μg/kg) ^a | NOAEL (μg/kg) |
|--------------|-----------------------|---------------------------------------|-----------------|
| Pinnatoxin E | Fed | 2800 (2380–3000) | 600 |
| Pinnatoxin F | Fed | 25.0 (19.1–35.1) | 9.9 |
| Pinnatoxin F | Fasted | 29.9 (25.0–32.0) | ND ^b |
| Pinnatoxin G | Fed | 150 (105–199) | 75 |

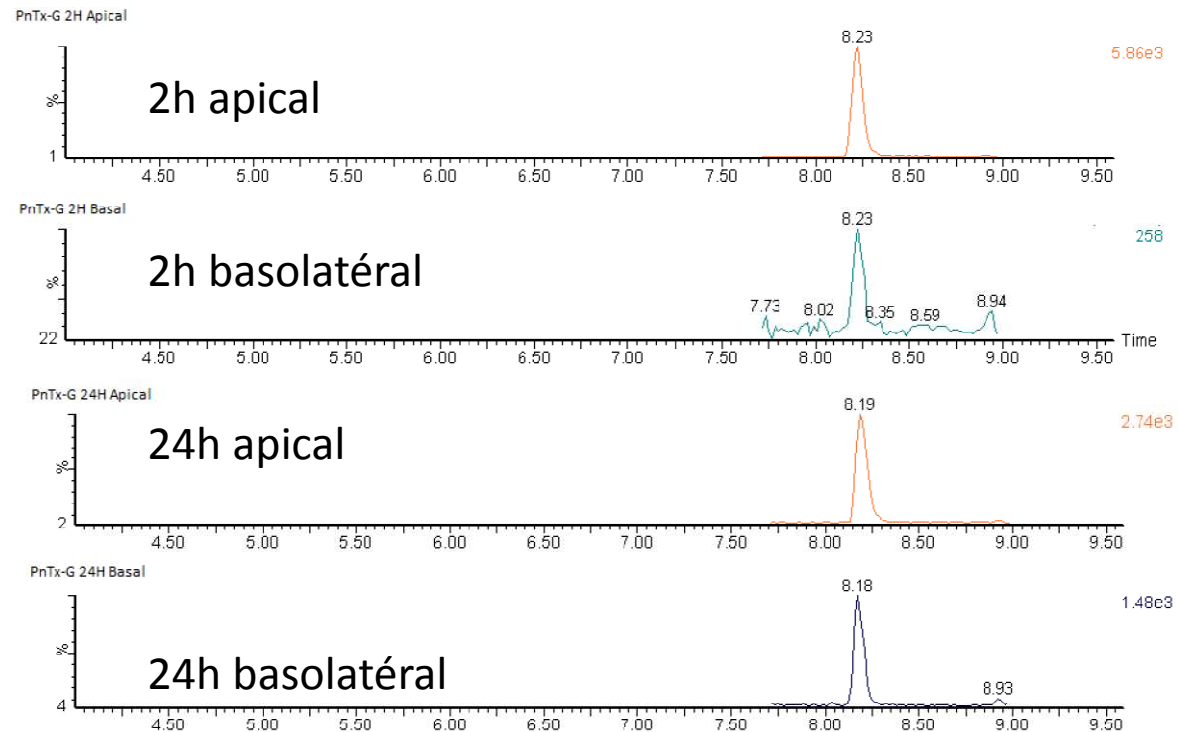
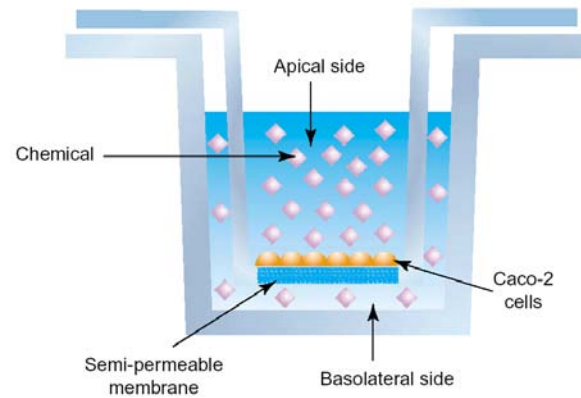
^a Figures in brackets indicate 95% confidence intervals.

^b Not determined.

Munday et al., 2012, Toxicon 60 995-999: Acute toxicity of pinnatoxins E, F and G to mice.

→ Toxicité orale par gavage supérieure à celle de l'acide okadaïque, mais....

Modèle cellulaire du passage à travers la barrière intestinale



→ Passage lent mais aisé à travers la monocouche cellulaire ! → potentiel toxique !!

Conclusions

Caractéristiques de l'organisme :

V. rugosum a une phase du cycle cellulaire benthique ou épiphyte

Croissance lente : facteur 2 à 4 plus lente que les μ algues pélagiques

Toxicité cellulaire de l'ordre du picogramme/cellule

Pinnatoxines :

PnTX-G : analogue prévalent en μ algues et moules

A Ingril, les concentrations en PnTX-G dépassent les niveaux reportés en NZ, NO

PnTX-G : plus stable que d'autres imines cycliques (conditions acides et alcalines)

Toxicité :

Les niveaux expliqueraient largement les toxicités atypiques rencontrées depuis 2006

La PnTX – G naturelle a la même activité que la synthétique (elles sont identiques)

Fort potentiel neurotoxique, doutes sur l'implication maladies neuro-dégénératives

PnTX-G : non cytotoxique mais extrait brut *V. rugosum* très cytotoxique

PnTX-G : passe à travers une monocouche de cellule Caco2

Remerciements aux financeurs de ces travaux:

Ifremer (ALTAX, RISCAP)

Région des Pays de la Loire
(Parti scientifique: COINACOQ, 2008)

Direction Générale de l'Alimentation
(Programme 206, sous-action 32,
2011/203/2100482701)



Merci de votre at