

---

# 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	<b>Catherine Belin</b> , Dominique Soudant & Alice Lamoureux Ifremer, Nantes
Indicateurs DCE physico-chimie en eaux côtières et de transition	<b>Anne Daniel</b> & Dominique Soudant Ifremer, Nantes et Brest
Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin (DCSMM). Première tentative de définition du Bon Etat Ecologique. Descripteur Eutrophisation	<b>Alain Lefebvre</b> 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	<b>Luis Felipe Artigas</b> 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.	<b>Tania Hernández-Fariñas</b> Ifremer, Nantes
Apports du réseau REPHY aux réseaux de l'Observatoire National de la Conchyliculture (RESCO et VELYGER)	<b>Elodie Fleury</b> , 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	<b>Francis Gohin</b> & P. Bryère Ifremer, Brest et ACRI-ST, Brest
Produits issus de l'Océanographie Côtière Opérationnelle pour la surveillance	<b>Lucia Pineau-Guillou</b> , Alain Ménesguen & Francis Gohin Ifremer, Brest

Démarche qualité pour la bancarisation des données REPHY	<b>Mélanie Rapicault</b> Ifremer, Nantes
Diffusion des données REPHY. Valorisations aux niveaux nationaux et internationaux	<b>Antoine Huguet</b> Ifremer, Nantes
Working Group on Phytoplankton and Microbial Ecology (WG-PME)	<b>Dominique Soudant</b> Ifremer, Nantes
Produits de données WEB	<b>Alain Le Magueresse</b> Ifremer, Nantes
Etude d'optimisation du REPHY. Perspectives à court et moyen terme	<b>Catherine Belin</b> 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	<b>Virginie Hossen</b> Anses, Maisons-Alfort
Point sur l'évolution du dispositif de surveillance des toxines lipophiles par analyse chimique	<b>Sophie Trotereau</b> Anses, Maisons-Alfort
Bilan national phytoplancton toxique et phycotoxines de 2009 à 2011	<b>Catherine Belin &amp; Zouher Amzil</b> Ifremer, Nantes
Dynamique spatio-temporelle des peuplements de <i>Pseudo-nitzschia</i> en Bretagne	<b>Raffaele Siano</b> 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	<b>Mathilde Schapira</b> 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.	Aurélie Lelong, Hélène Hégaret & <b>Philippe Soudant</b> IUEM-LEMAR-UBO, Brest
Toxicité amnésiante dans les coquilles St Jacques des Pertuis charentais en 2010 - 2011	<b>Mireille Ryckaert</b> Ifremer, La Rochelle
<i>Ostreopsis</i> en Méditerranée: enjeux, répartition géographique du stock macro-algal, vers une surveillance spécifique?	<b>Hubert Grossel</b> Ifremer, Toulon
Dispositif de vigilance phycotoxines. Bilan 2010-2011	<b>Nadine Neaud-Masson</b> Ifremer, Nantes
Etude des Pinnatoxines en lien avec l'espèce <i>Vulcanodinium rugosum</i>	<b>Philipp Hess</b> 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**



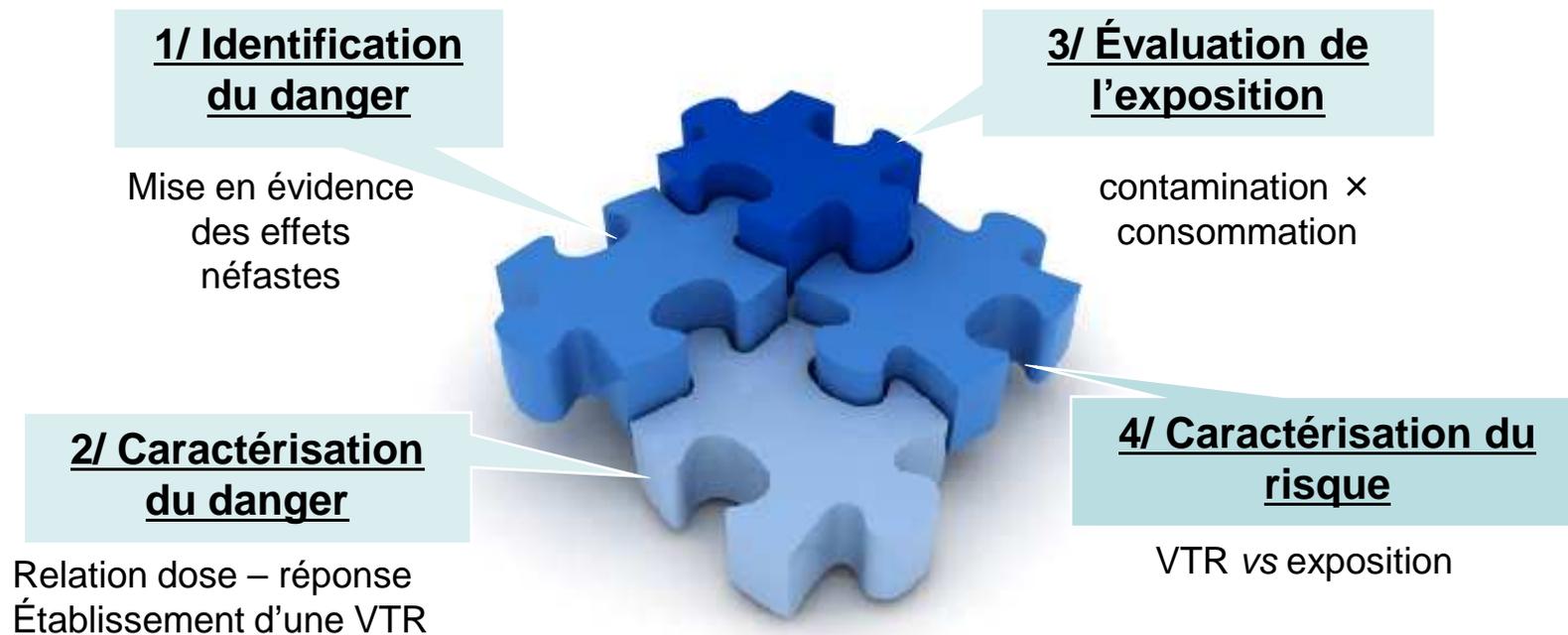
**LNR et réseaux de labos REPHY et LDA**

## 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 group<sup>1</sup>

Efsa Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM)<sup>2,3</sup>

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.

<sup>1</sup> On request from the European Commission, Question No EFSA-Q-2005-0650, adopted on 26 November 2005.

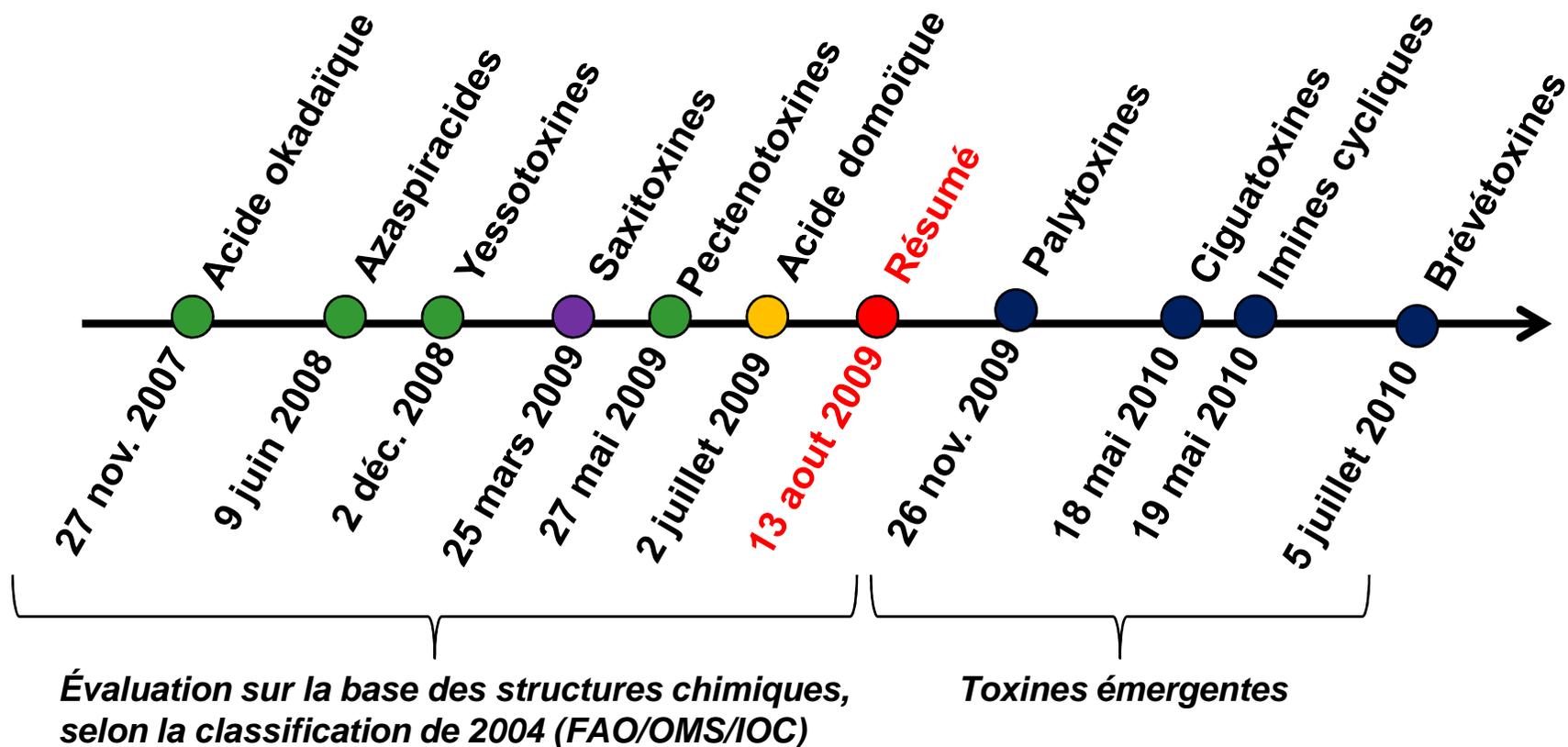
<sup>2</sup> Panel members: Jan Alexander, Diane Benford, Alan Boobis, Sandra Coccastelli, Jean-Pierre Cravedi, Alessandro Di Domenico, Daniel Dorigo, Eugenia Deglietti, Lutz Edler, Peter Farmer, Melika Filipič, Johanna Fink-Gremmler, Peter Flist, Thierry Guerin, Heide Katrine Knutsen, Miroslav Machala,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

Correspondence: [contam@efsa.europa.eu](mailto:contam@efsa.europa.eu)

<sup>3</sup> 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 Viazza 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/efsa.2009.1393. Available online: [www.efsa.europa.eu](http://www.efsa.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**

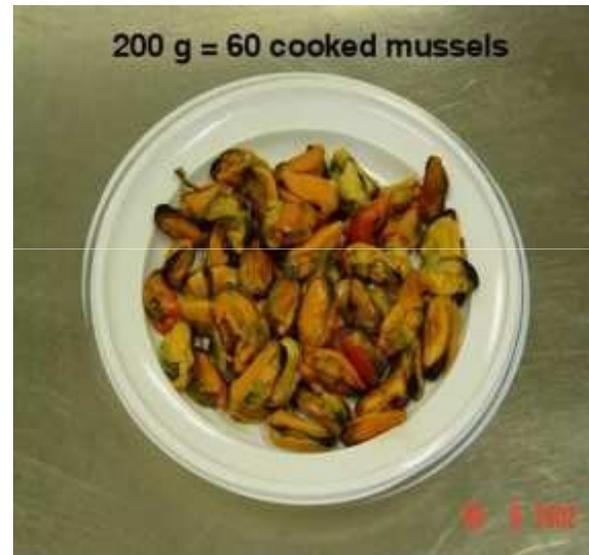


## Fixation de la dose de référence aiguë par famille :

	Espèce	Effet	LOAEL (µg/ kg pc)	FACTEUR DE SÉCURITÉ	ARfD (µg/kg pc)
<b>AO/DTX</b>	<b>Homme</b>	Gastro-intestinal	0,8	3	0,3
<b>AZA</b>	<b>Homme</b>	Gastro-intestinal	1,9	(3*3) 9	0,2
<b>PTX</b>	Souris	Gastro-intestinal	250	(100*3) 300	0,8
<b>YTX</b>	Souris	Cardiotoxique	5000 (NOAEL)	(100*2) 200	25
<b>STX</b>	<b>Homme</b>	Neurotoxique	1,5	3	0,5
<b>AD</b>	<b>Homme</b>	Neurotoxique	0,9	(10*3) 30	30
<b>PITX</b>	Souris	<i>Musculaire</i>	200	(100*10) 1000	0,2
<b>CTX</b>	Données insuffisantes pour fixer ARfD Sur la base des cas humains (effets gastro-intestinaux, neurologiques, cardiovasculaires): « dose sans effet » chez l'Ho = 0,01 µg eq.P-CTX-1/kg poisson				
<b>Imines cycliques</b>	Données insuffisantes pour fixer ARfD				
<b>BTX</b>	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
<b>AO/DTX</b>	0,3	<b>45 µg eq.AO/kg</b>	160 µg eq.AO/kg
<b>AZA</b>	0,2	<b>30 µg eq.AZA1/kg</b>	160 µg eq.AZA1/kg
<b>PTX</b>	0,8	<b>120 µg eq.PTX2/kg</b>	160 µg <b>eq.AO</b> /kg
<b>YTX</b>	25	<b>3,75 mg eq.YTX/kg</b>	1 mg eq.YTX/kg
<b>STX</b>	0,5	<b>75 µg eq.STX/kg</b>	800 µg eq.STX/kg
<b>AD</b>	30	<b>4,5 mg AD+epiD/kg</b>	20 mg eq.AD/kg
<b>PITX</b>	0,2	<b>30 µg PITX + OSD/kg</b>	—
<b>CTX</b>	Données insuffisantes	<b>0,01 µg eq.P-CTX-1/kg</b>	—
<b>IC</b>	Données insuffisantes	—	—
<b>BTX</b>	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)	$\leq 20$ mg d'acide domoïque
Groupe des Brévetoxines (BTX)	$\leq 200$ unités souris ou équivalent
Groupe de l'Azaspiracide (AZP)	$\leq 0,16$ mg

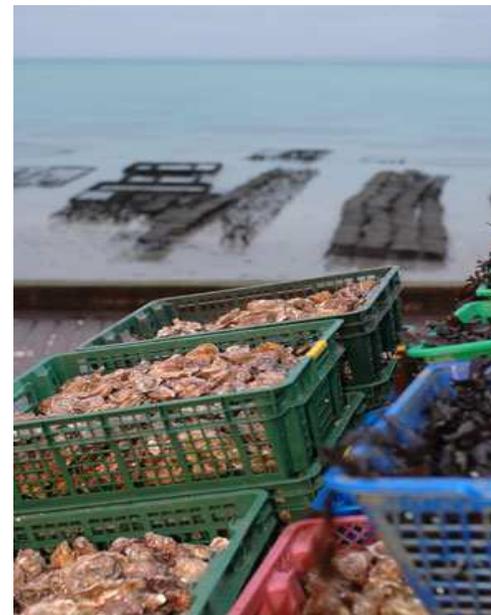
**Pas de limites maximales pour YTX et PTX....**

**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:

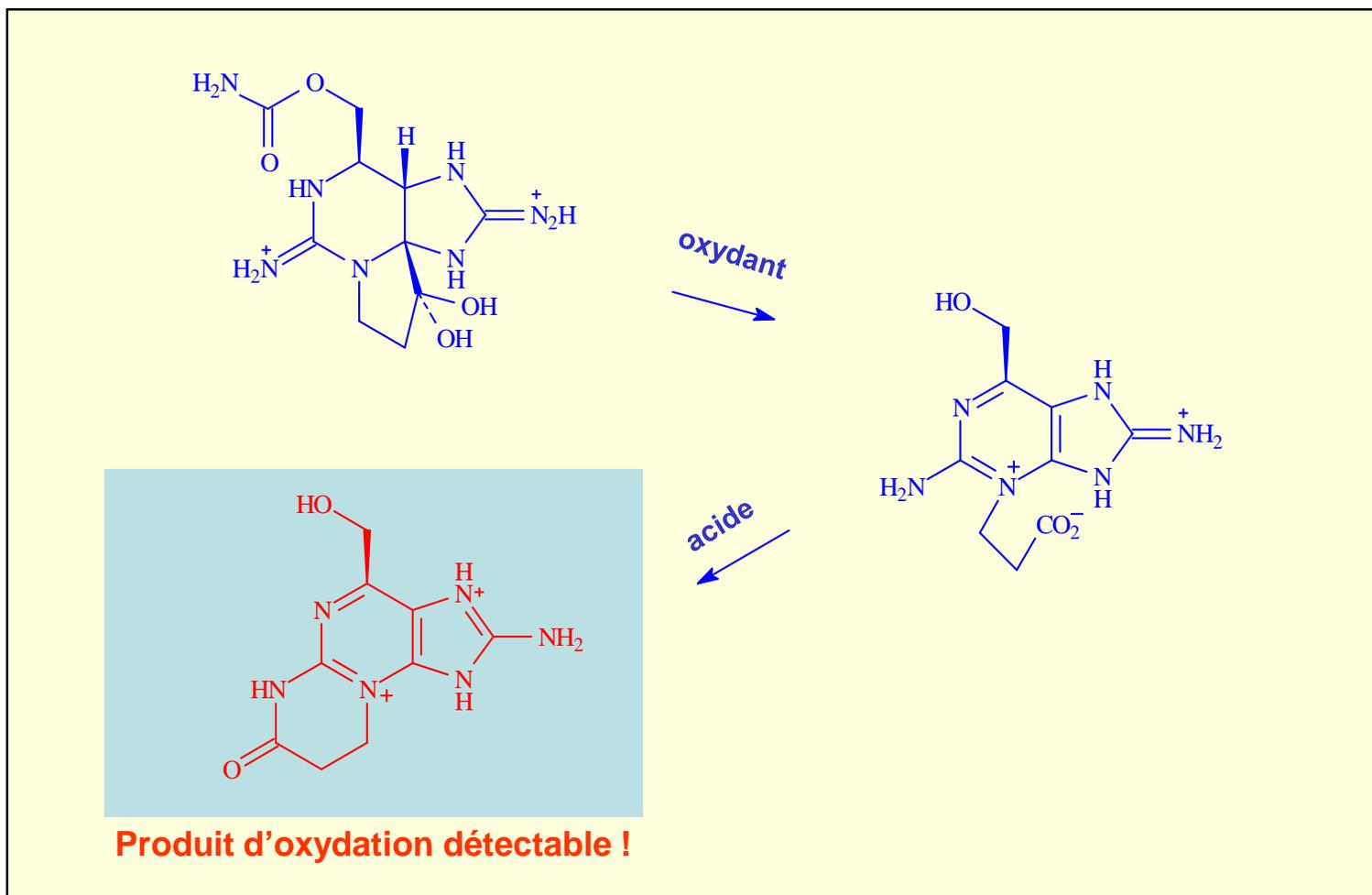
- a) pour le «Paralytic Shellfish Poison» (PSP), 800 microgrammes par kilogramme;
- b) pour le «Amnesic Shellfish Poison» (ASP), 20 milligrammes d'acide domoïque par kilogramme;
- c) pour l'acide okadaïque, les dinophysistoxines et les pectenotoxines pris ensemble, 160 microgrammes d'équivalent-acide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

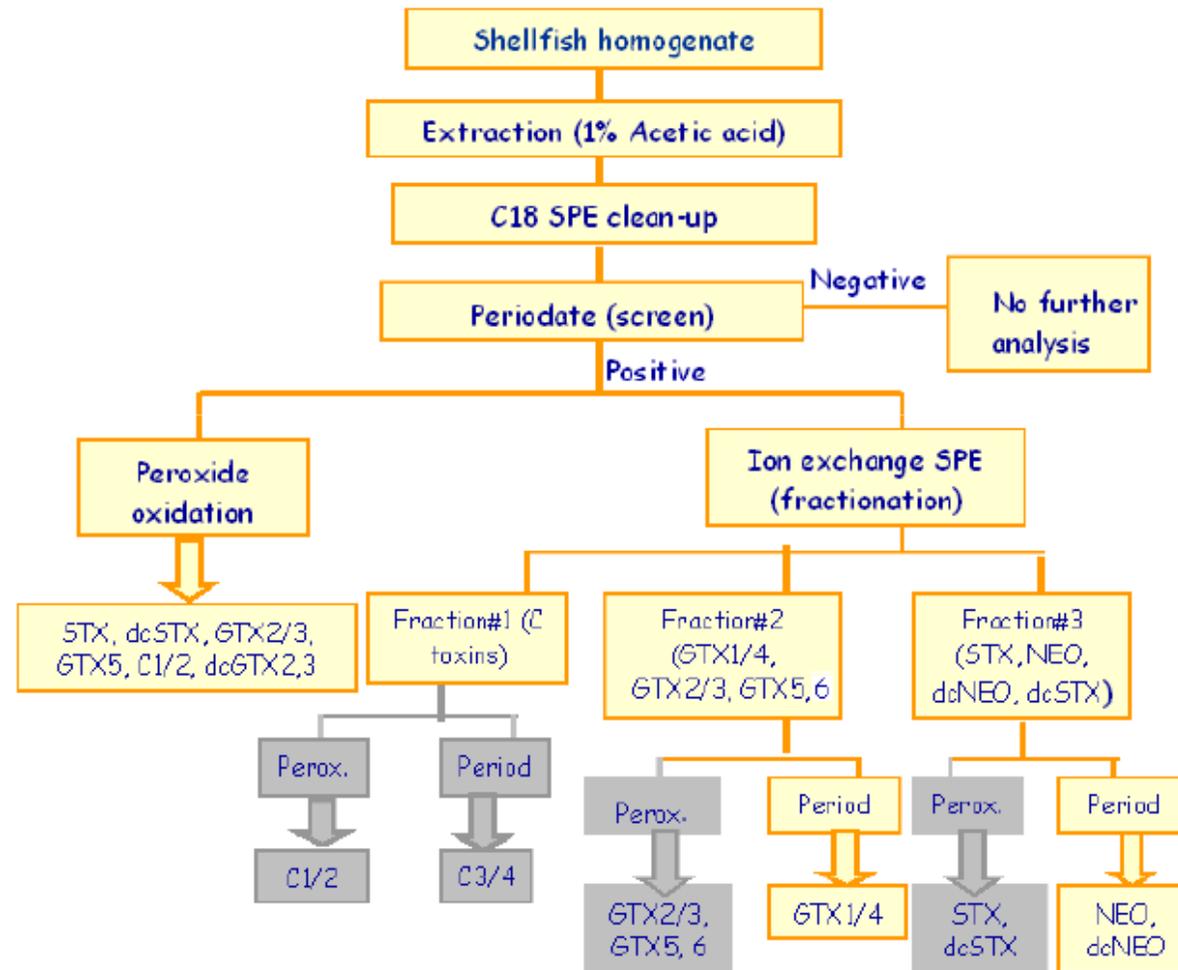


Figure 1. Scheme utilised for screening and quantitation of PSP toxins in mussel samples.

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

---

-1<sup>er</sup> 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](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 :

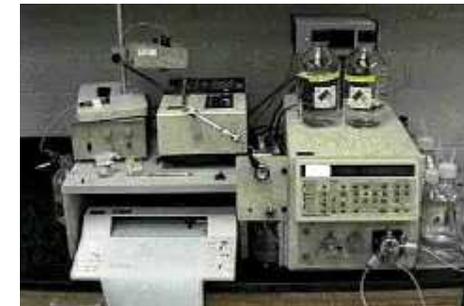
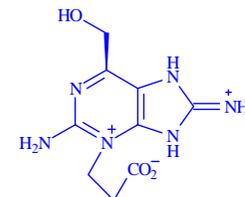
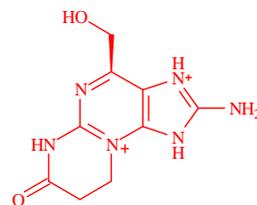
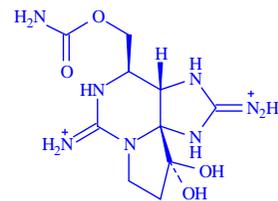
- Non validée pour dc-NEO et GTX6
- utilisation de **2 colonnes chromatographiques** (pour toxines C et pour GTXs/STXs)

## → 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



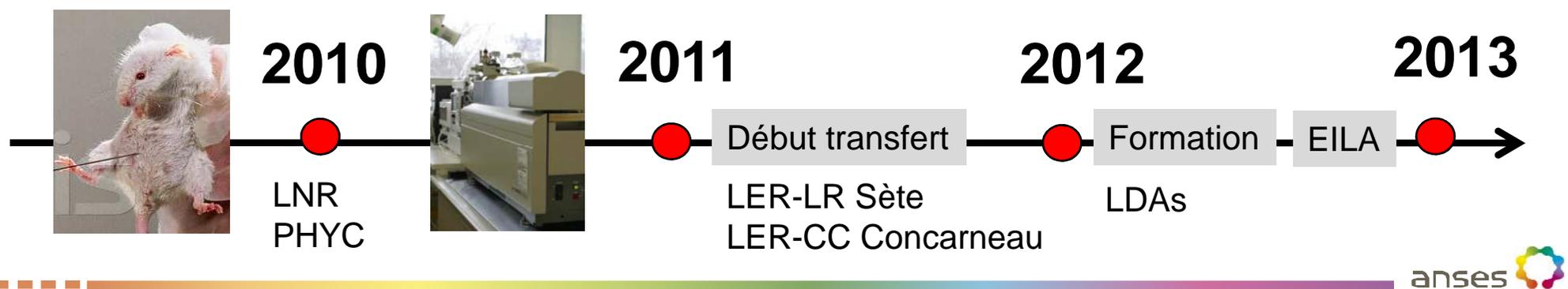
# Point sur l'évolution du dispositif de surveillance des toxines lipophiles par analyse chimique

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

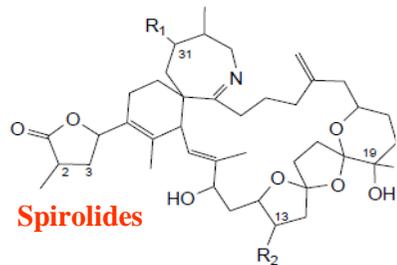
## Eléments abordés

- 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



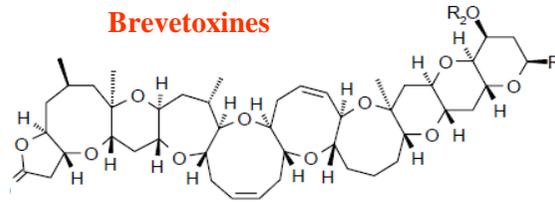


Passage du bio essai sur souris  
(toxicité globale)  
→ surveillance ciblée des toxines  
réglementées (profil toxinique)

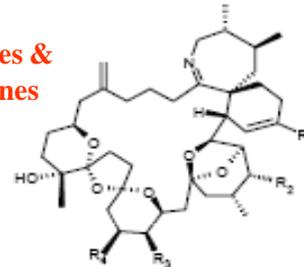


## Toxines lipophiles (DSP)

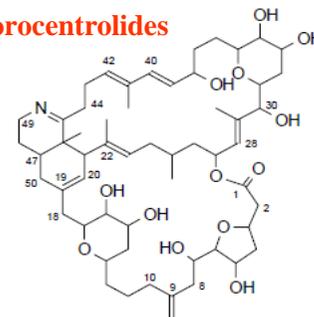
### Brevetoxines



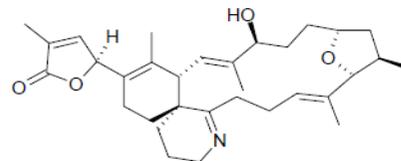
### Pinnatoxines & pteriatoxines



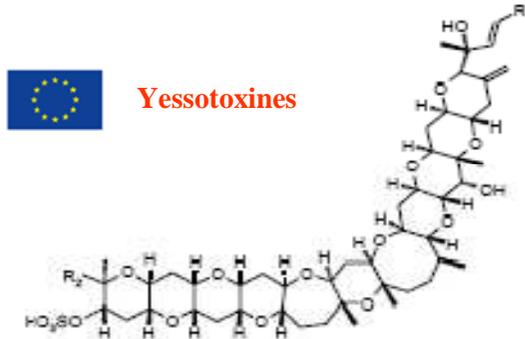
### Prorocentrolides



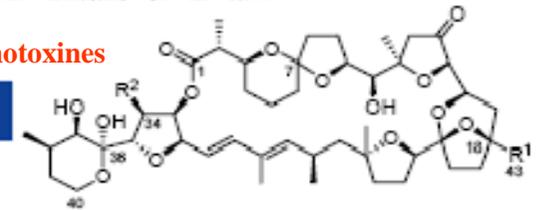
### Gymnodimine



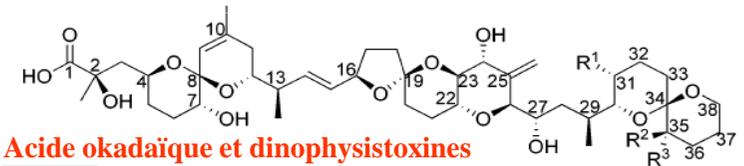
### Yessotoxines



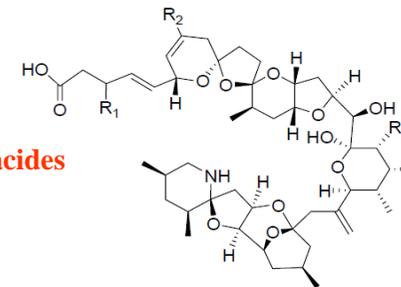
### Pectenotoxines



### 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



**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**

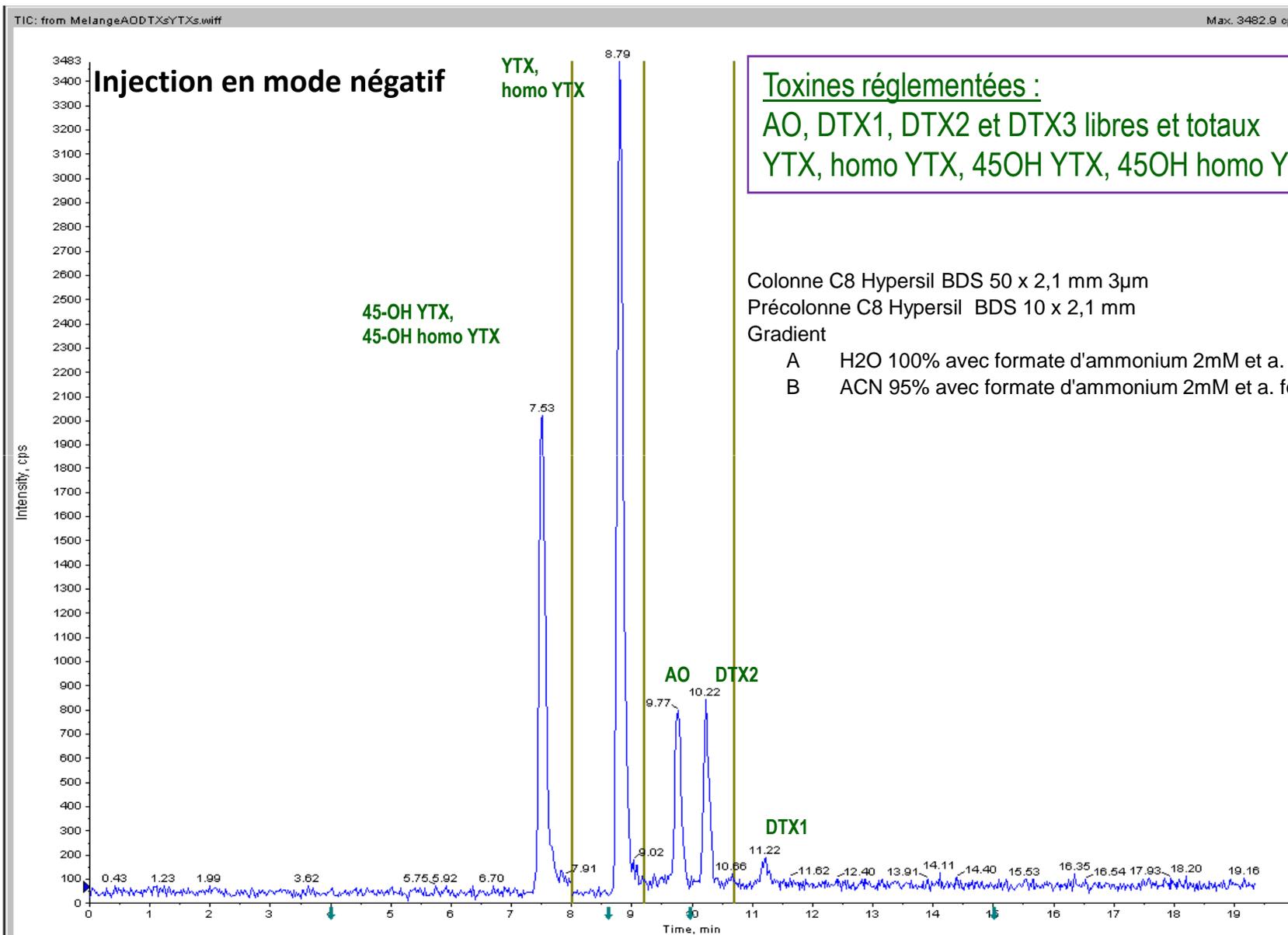
**440 PSPC DGAL**

**189 auto-contrôles + 14 TIAC**

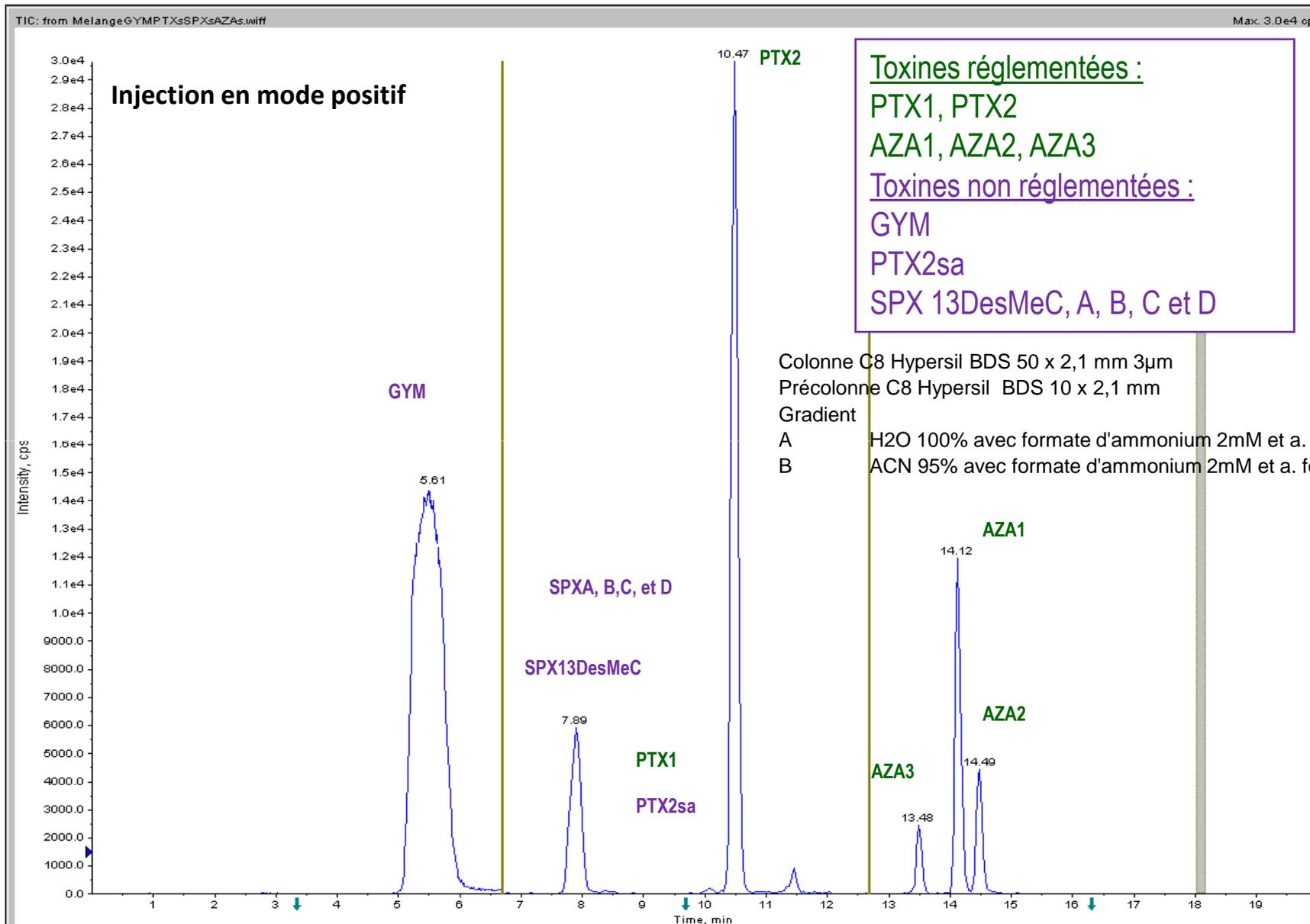
**Délai de réponse 5 à 10 jours**

# Chromatogramme en mode négatif

LNR



LNR

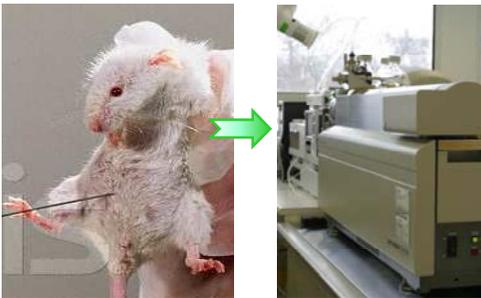


Règlement (UE)  
N° 15/2011  
de la commission  
du 10 janvier 2011  
qui amende  
le 2074 / 2005  
du 05/12/2005 :

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](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

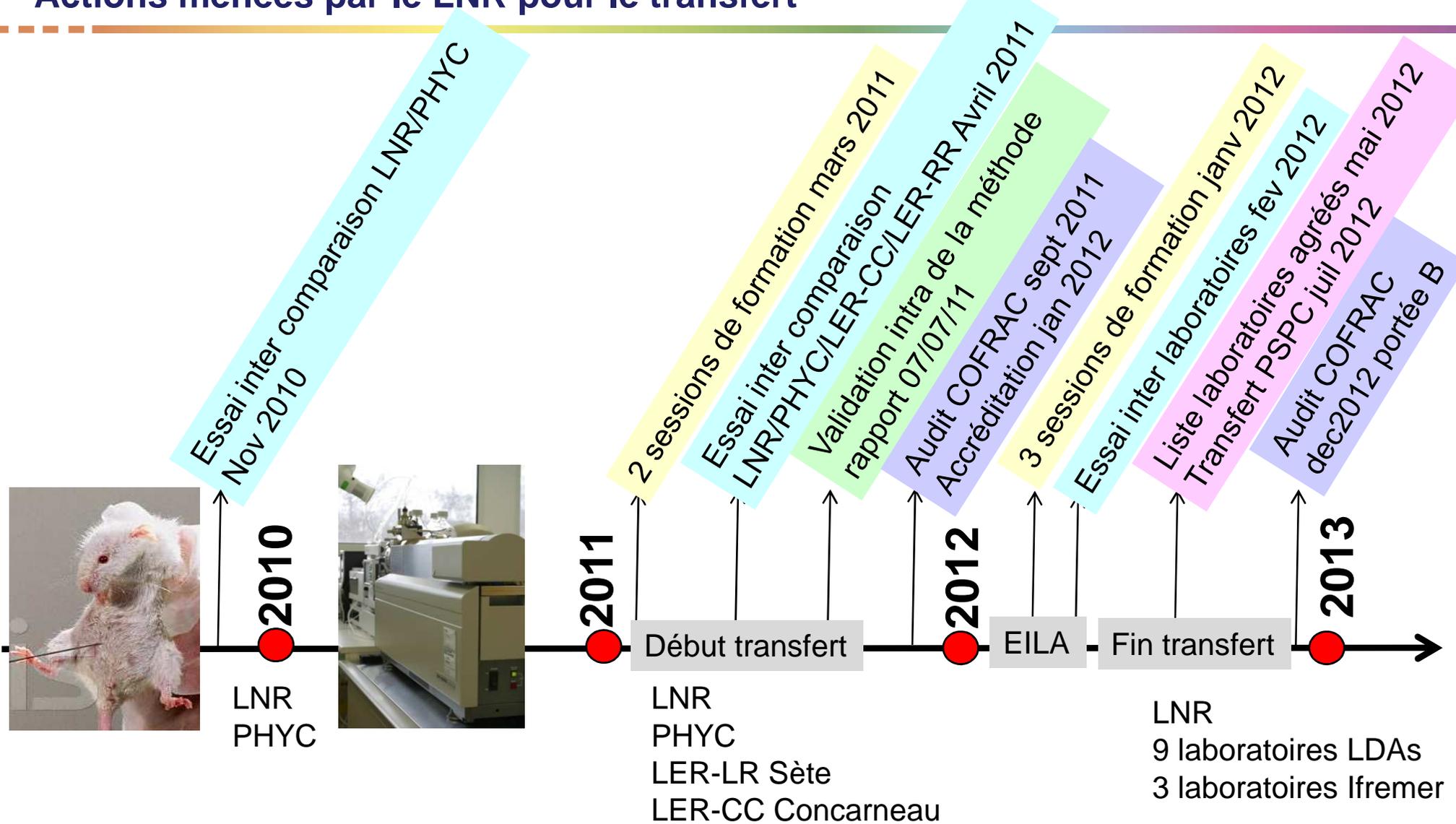
### Assurance Qualité

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



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.



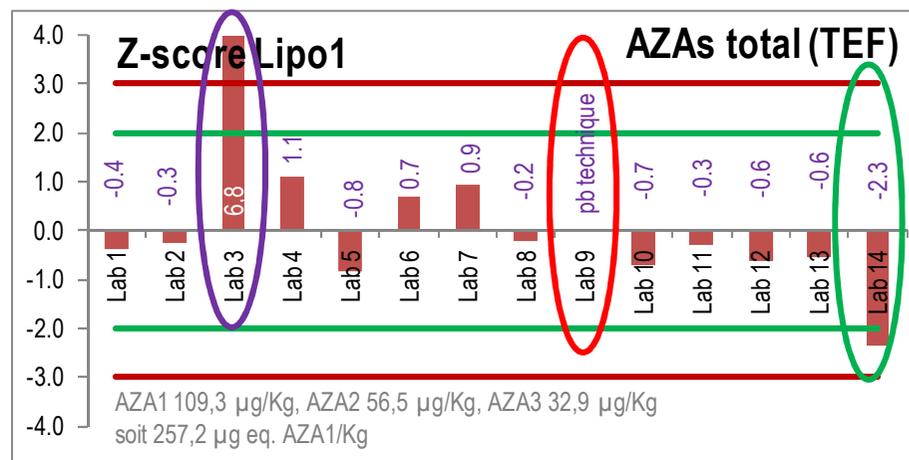
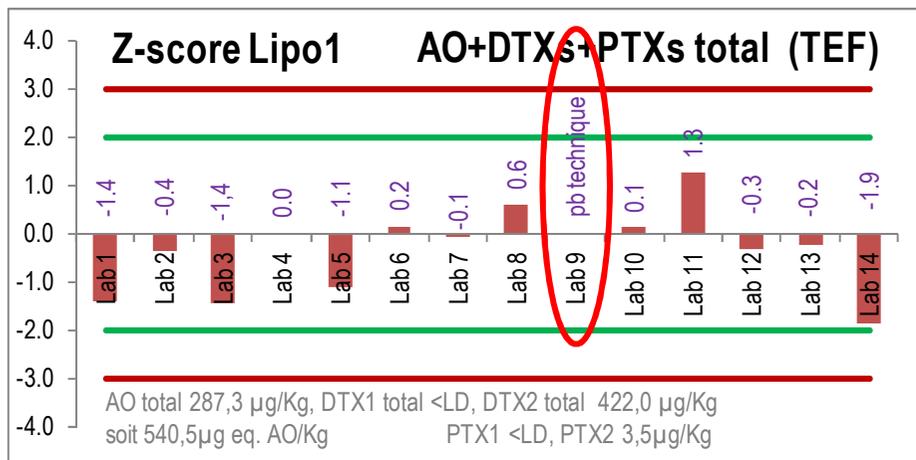
AO+DTXs+PTXs (TEF) = 540,5 µg eq.AO/kg	> seuil de 160 µg eq.AO/kg
AZAs (TEF) = 257,2 µg eq.AZA/kg	> seuil de 160 µg eq.AZA/kg
YTXs (TEF) = 5,3 µg eq.YTX/kg	<<< seuil de 1 m eq.YTX/kg (LQ)

## Echantillon N° Lipo2

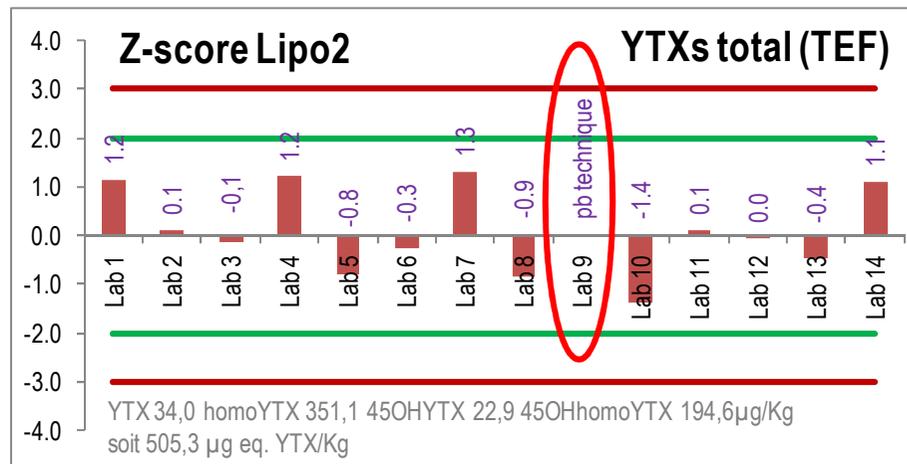
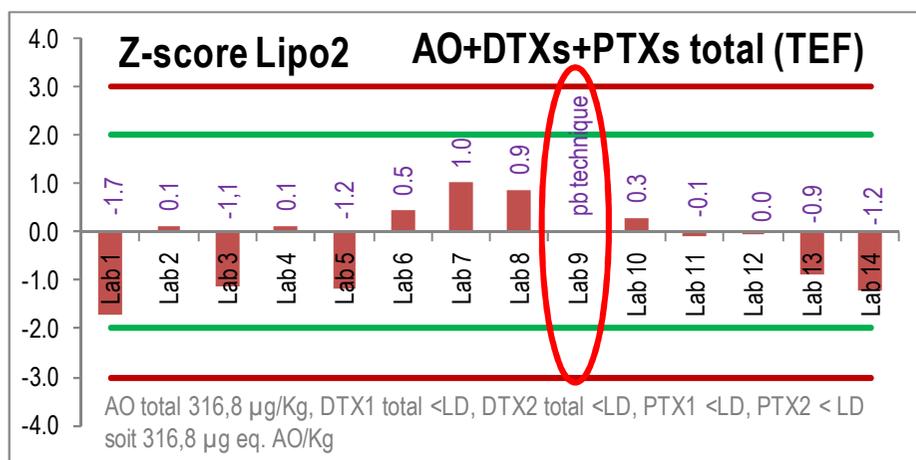
≈ 50 g de broyat de moules naturellement contaminées origine Italie,  
≈ 50 g de broyat de moules naturellement contaminées origine France et  
≈ 100 g de broyat de moules non contaminées origine France Coutainville.

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	1/2seuil 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

- Information
- Technology Research
  - Canada Institute for Space and Technical Research
  - Canadian Hydraulics Centre
  - Canadian Neutron Beam Facility
  - Canadian Photonics Laboratory
  - 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)

Journées REPHY 26 et 27 sept 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
<b>Total</b>	<b>589</b>	<b>355</b>	<b>487</b>	<b>67</b>	<b>1498</b>

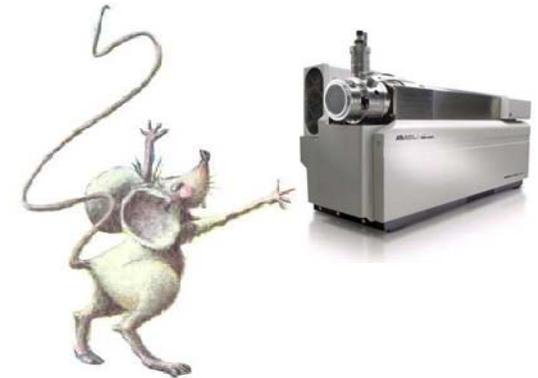
## Echantillons non conformes

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

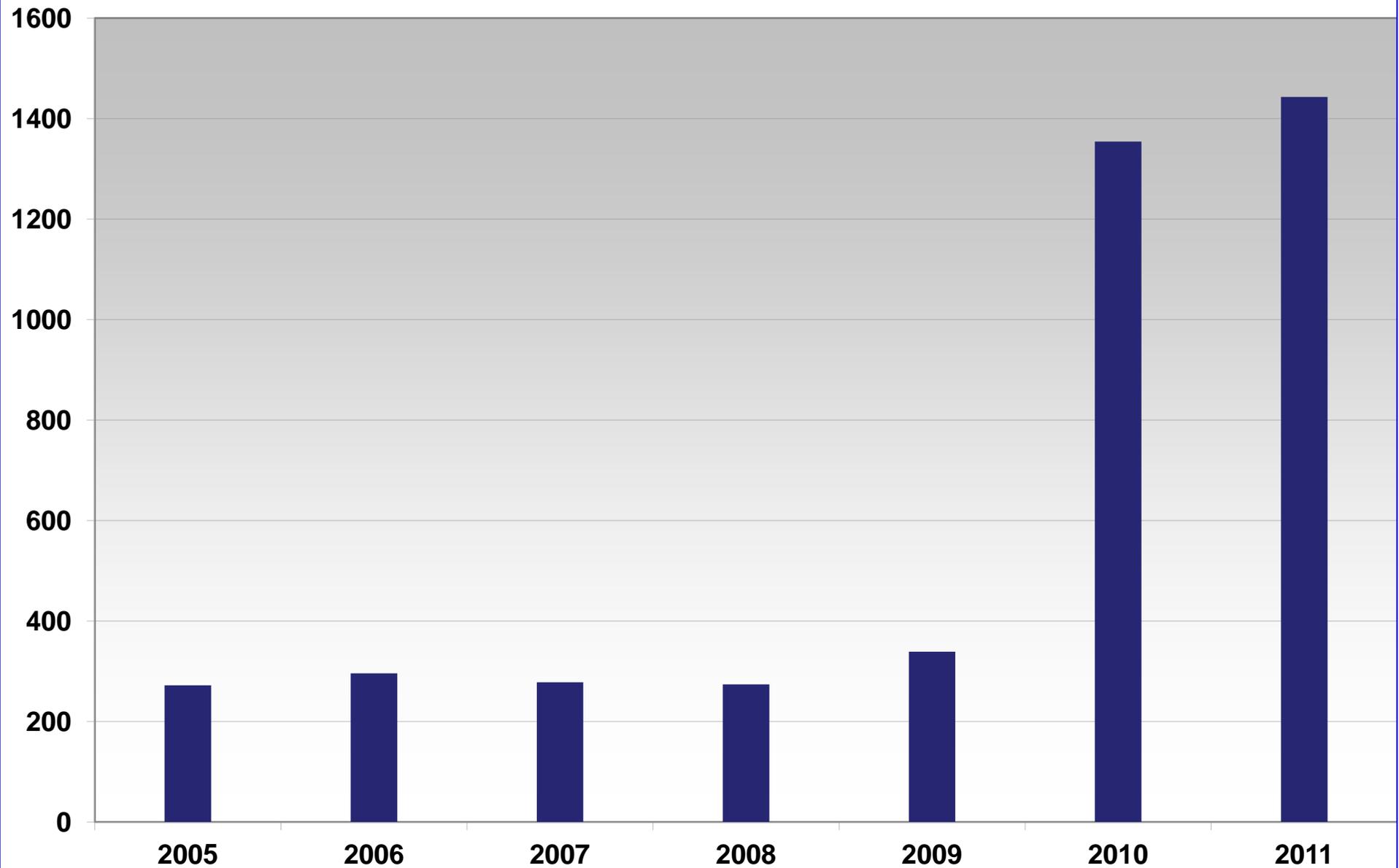
# Bilan national phytoplancton toxique et phycotoxines de 2009 à 2011

Catherine Belin & Zouher Amzil  
Ifremer, Nantes

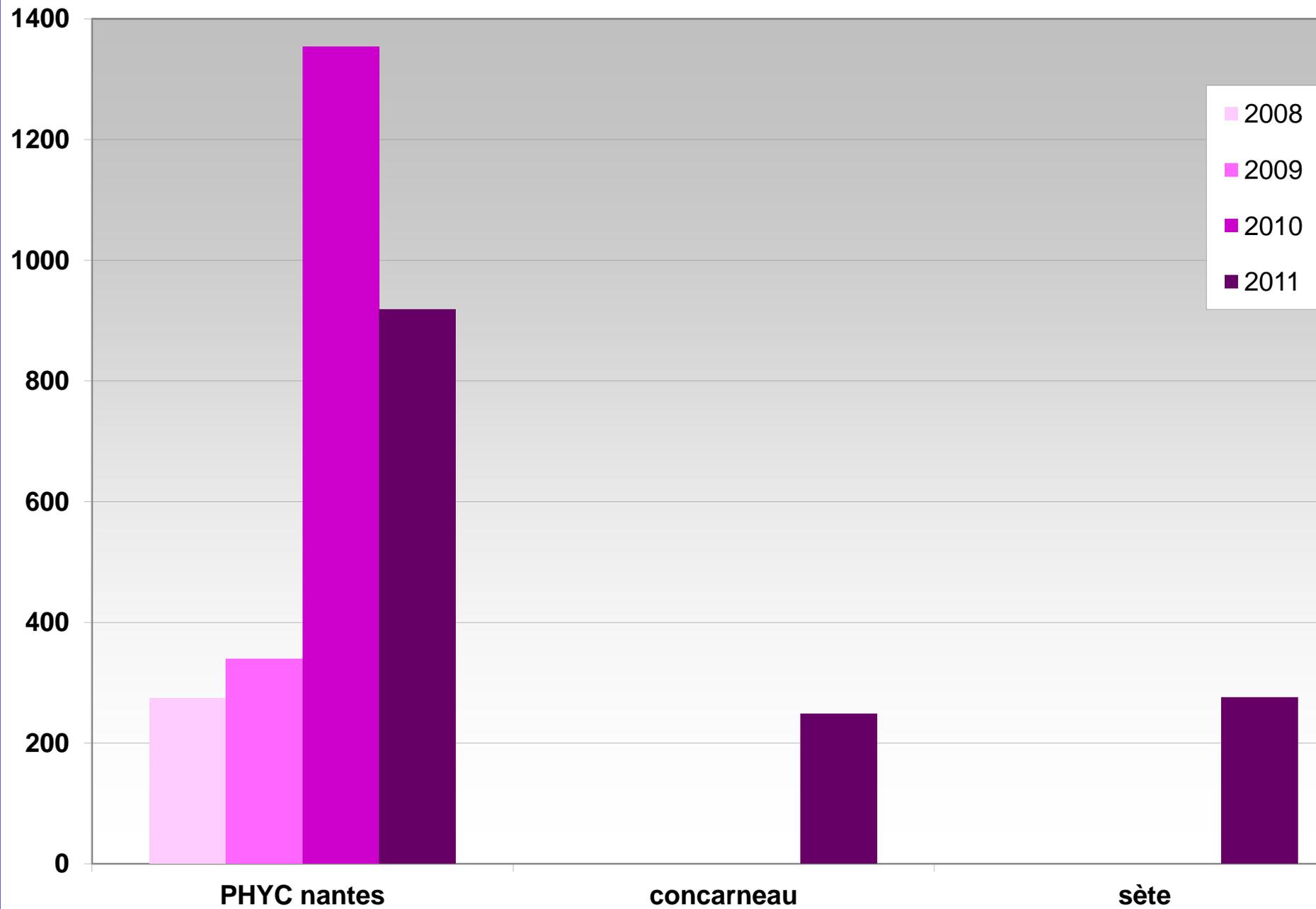
Bilan national  
phytoplancton toxique et phycotoxines  
2009 - 2011

Catherine Belin & Zouher Amzil  
Ifremer, Nantes

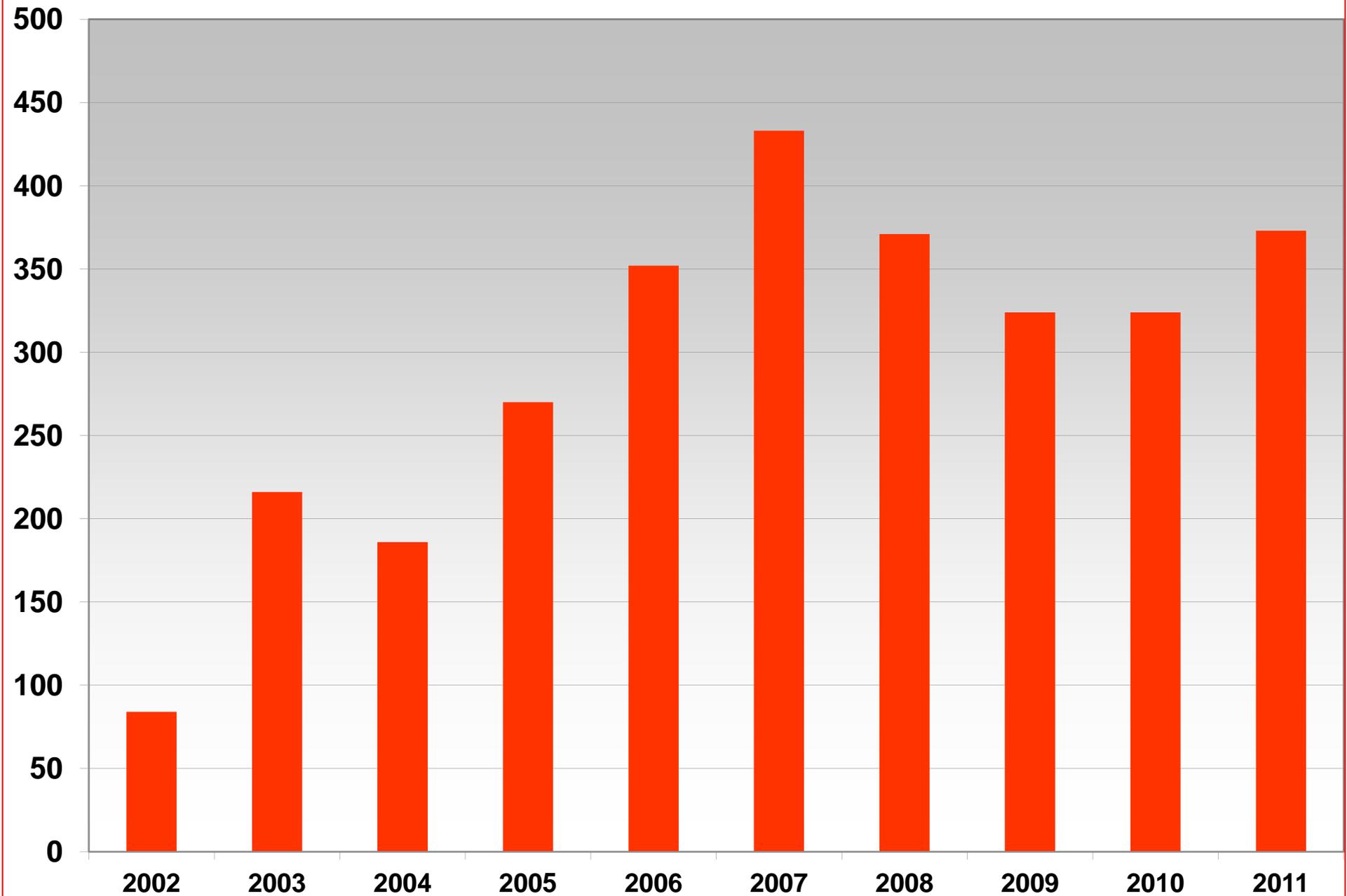
## REPHY : nombre d'analyses chimiques CL-SM/SM toxines lipophiles



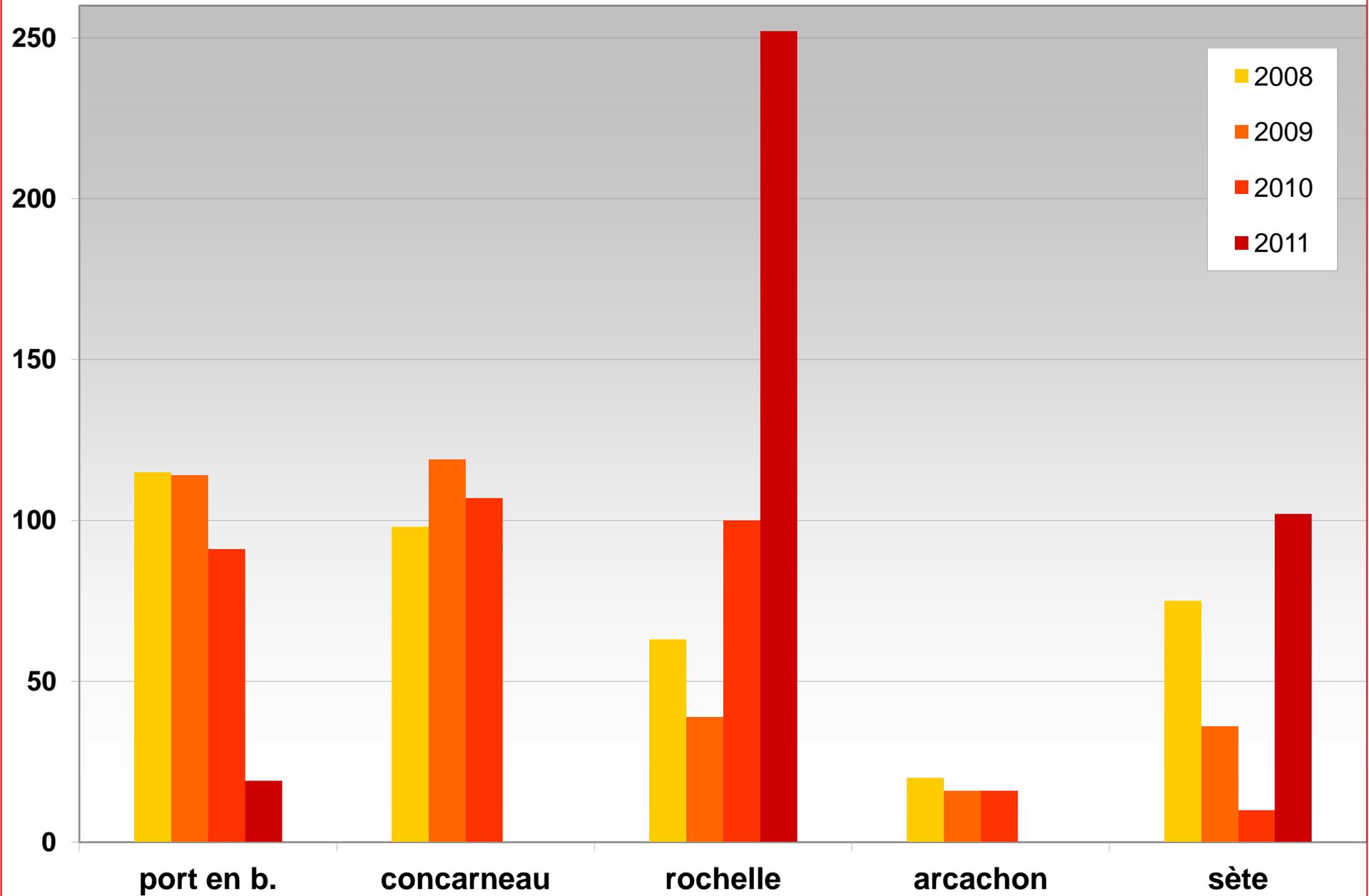
## REPHY : nombre d'analyses CL-SM/SM toxines lipophiles par labo analyste



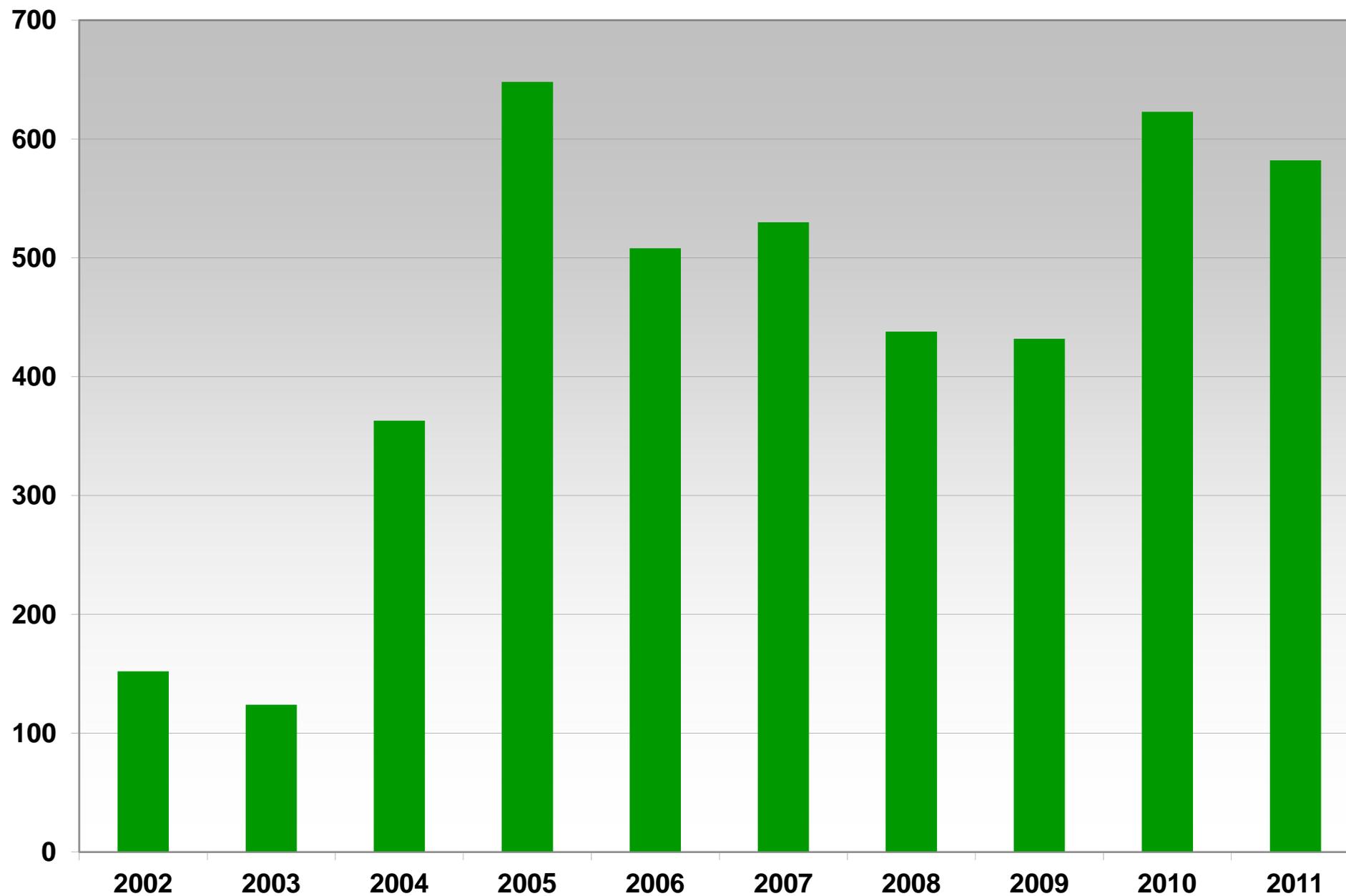
## REPHY : nombre de bio-essais PSP



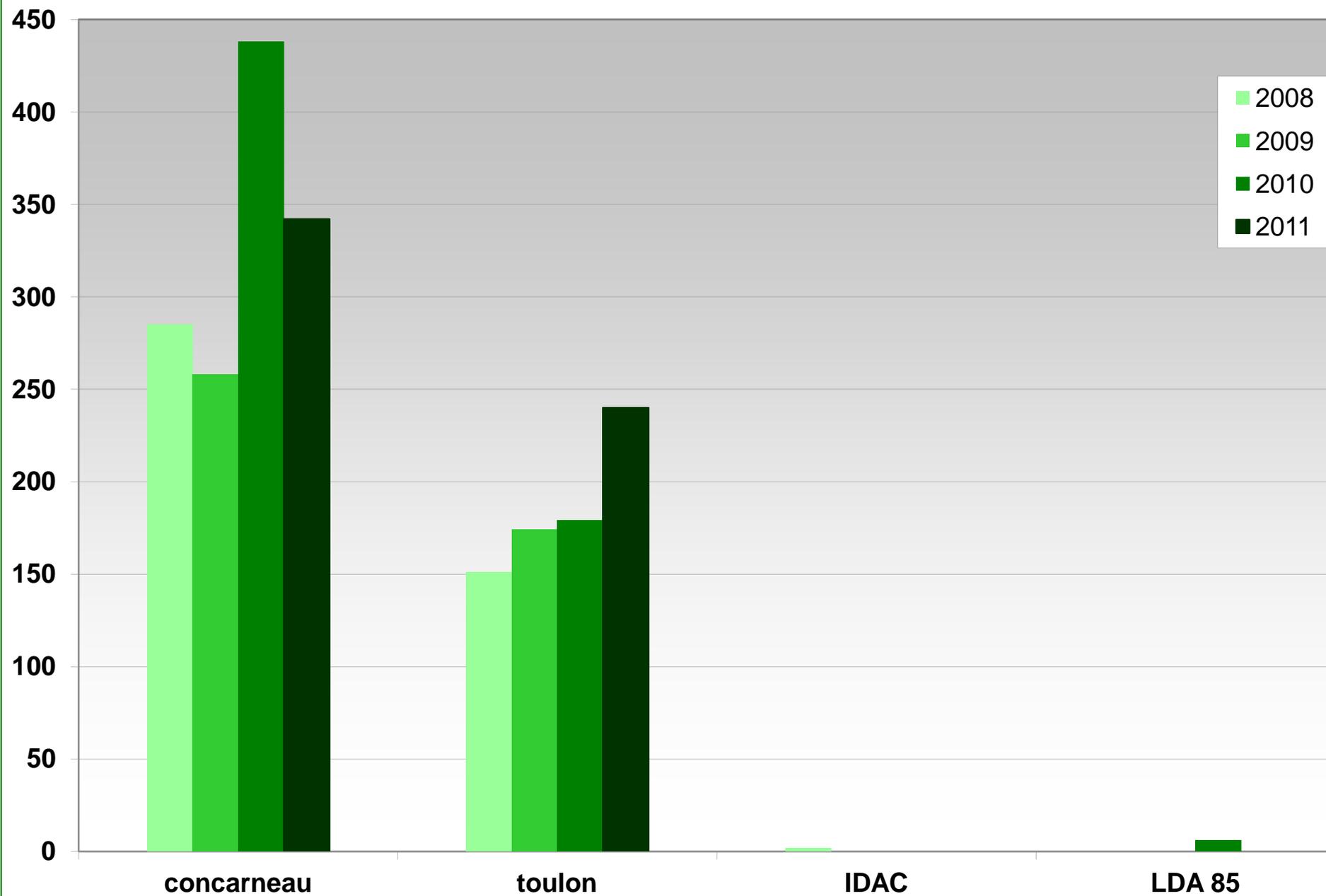
## REPHY : nombre de bio-essais PSP par labo analyste



## 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<sup>er</sup> 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

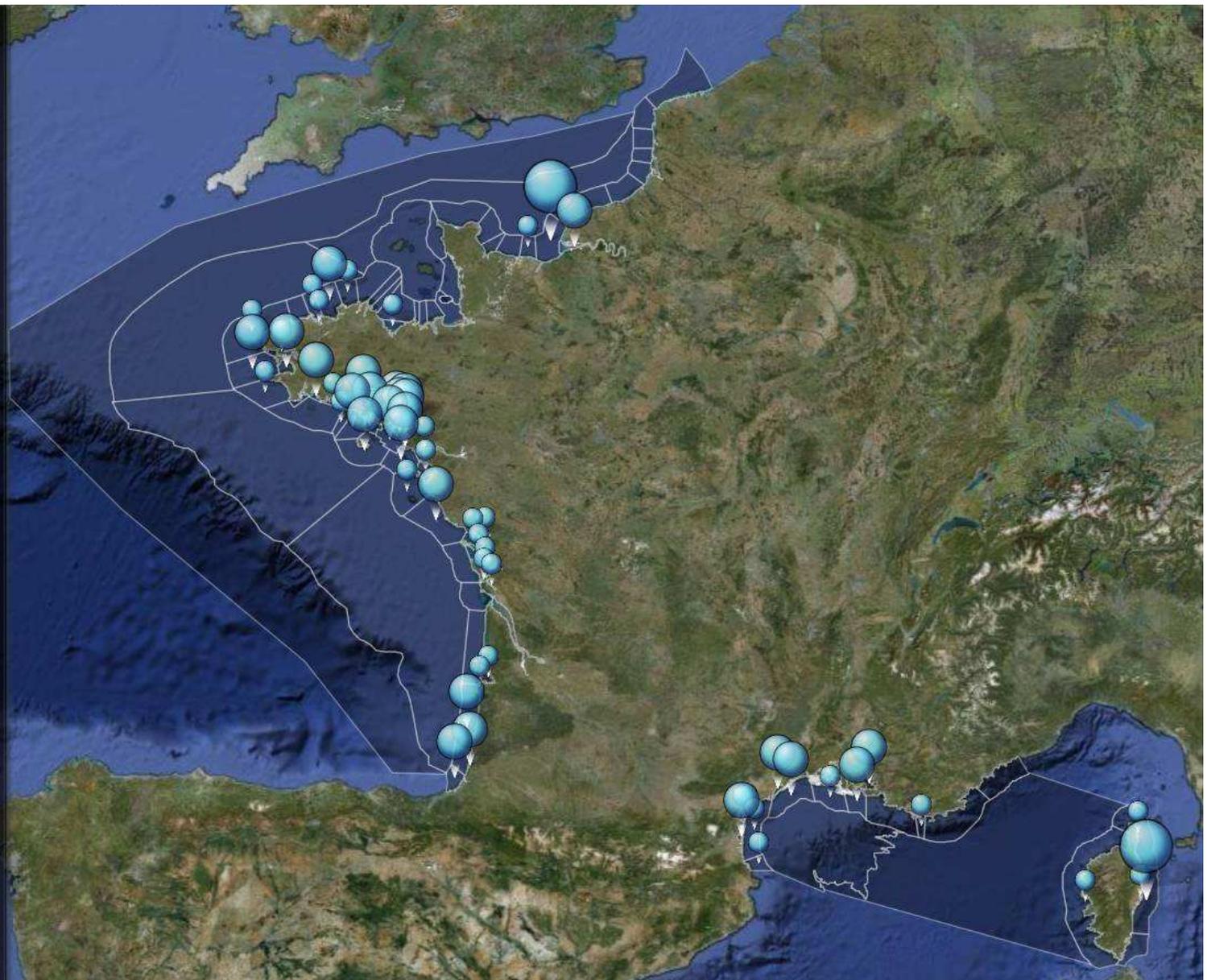
◀ ▶ ▷

▼ **Légende**

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

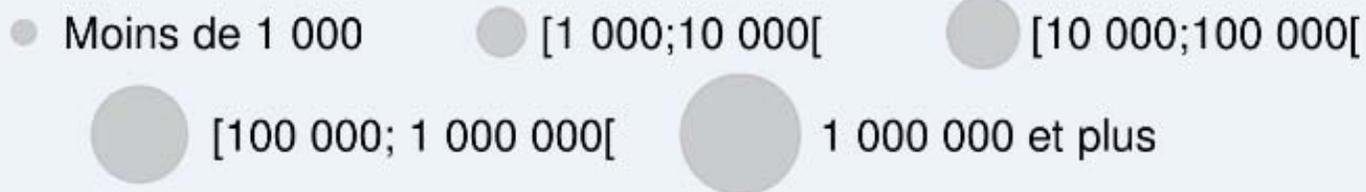
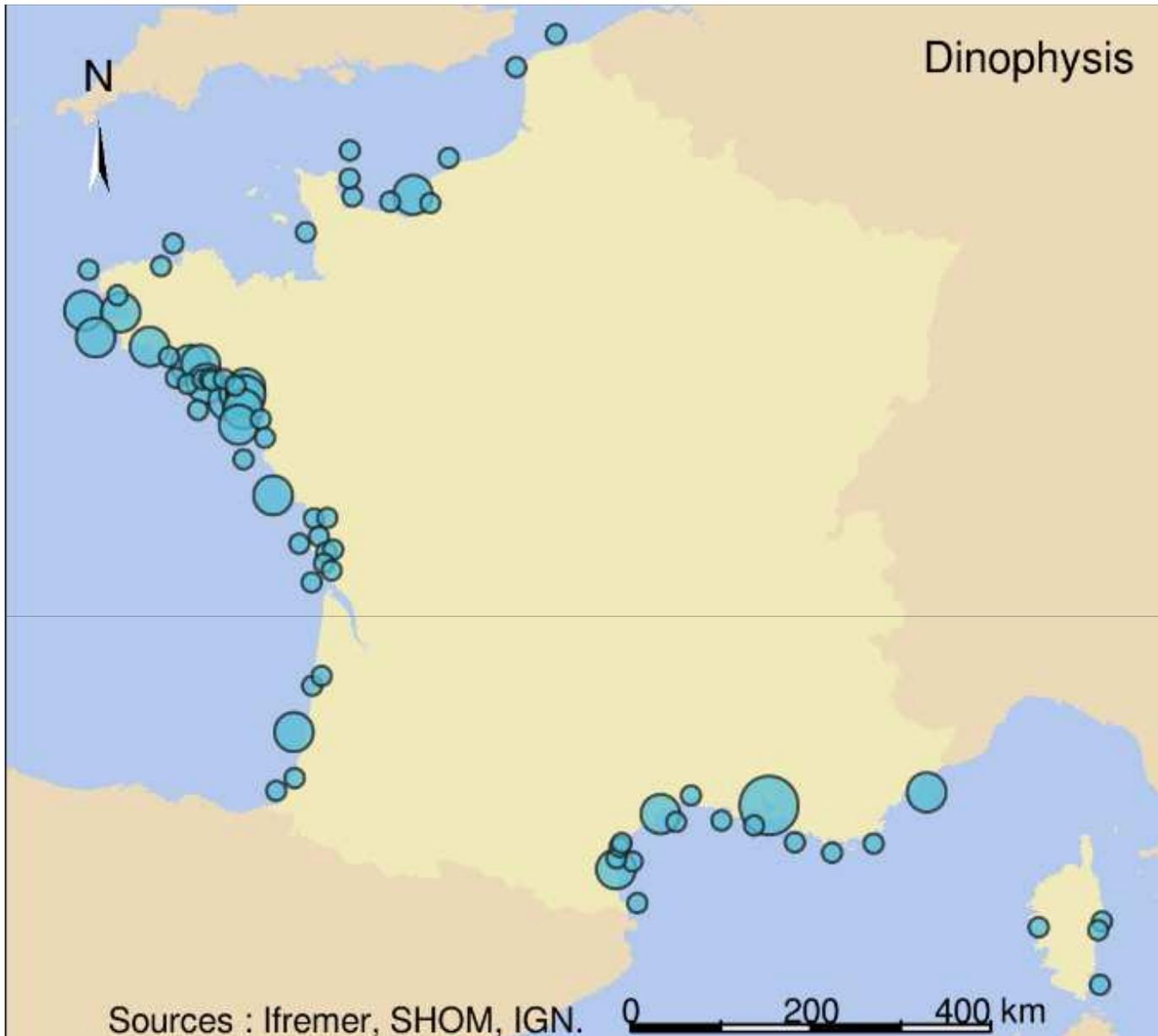
-  ]0, 1 000]
-  ]1 000, 10 000]
-  ]10 000, 100 000]
-  ]100 000, 1 000 000]
-  > 1 000 000

▶ **Commentaire**



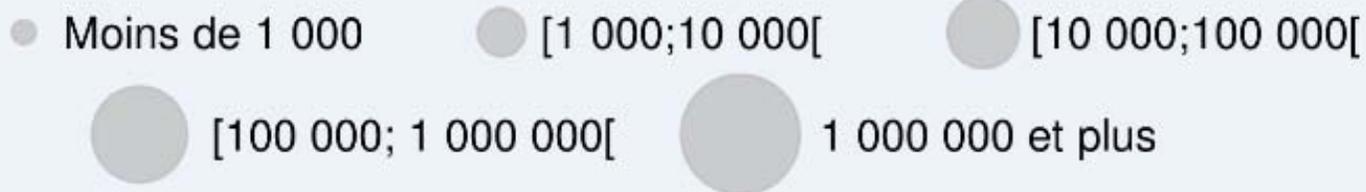
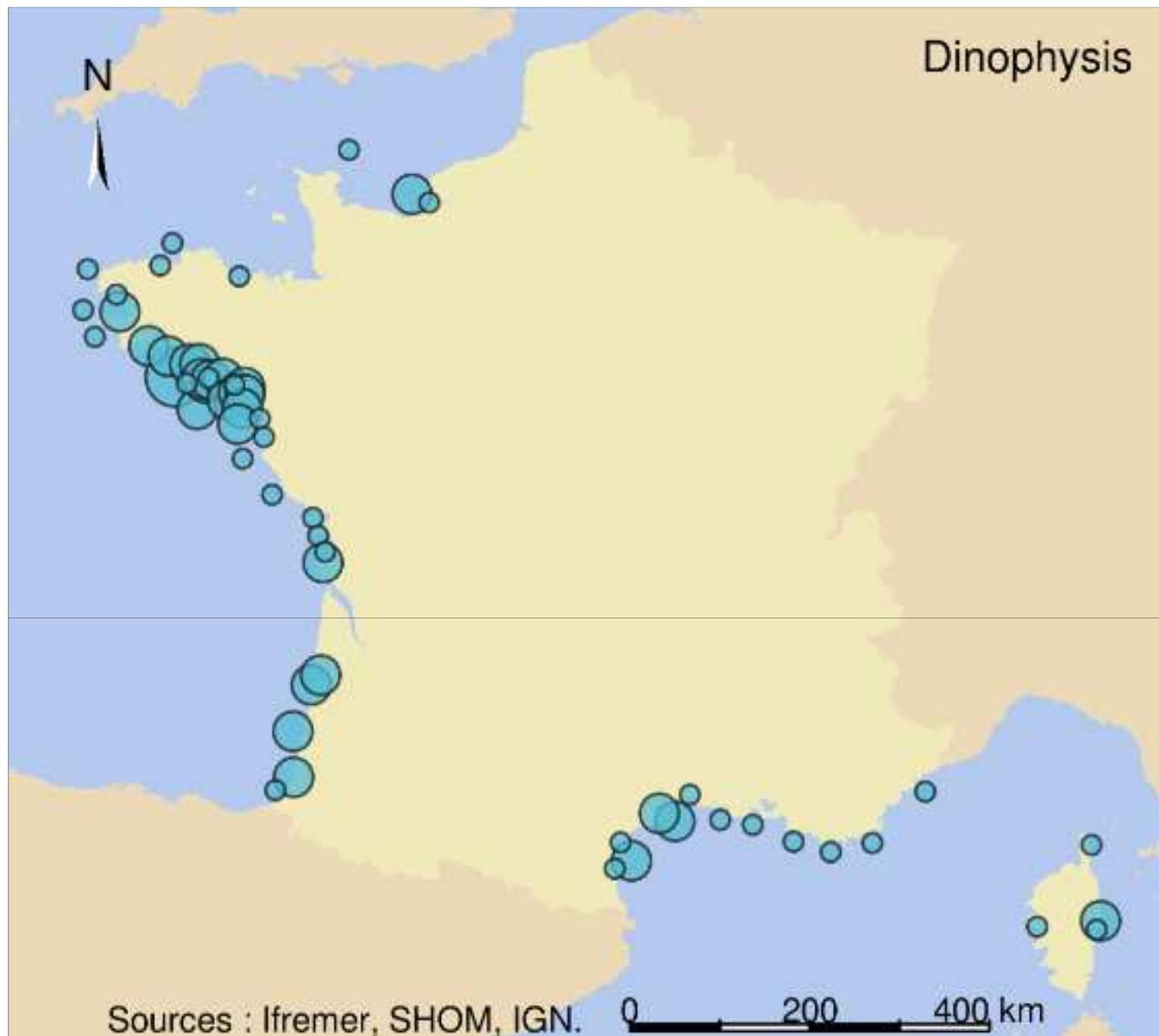
Dinophysis

2009



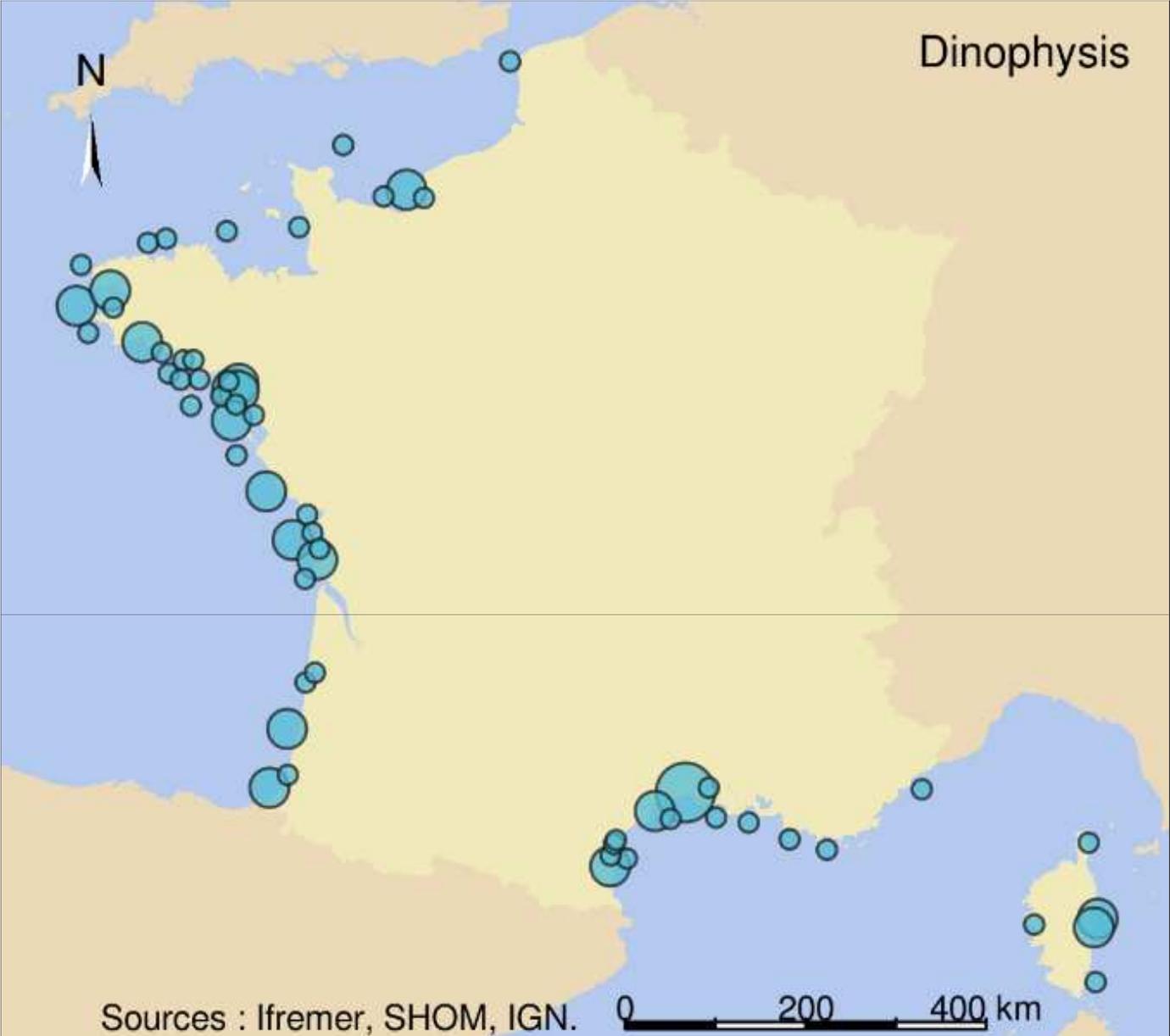
# Dinophysis

# 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 µg/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

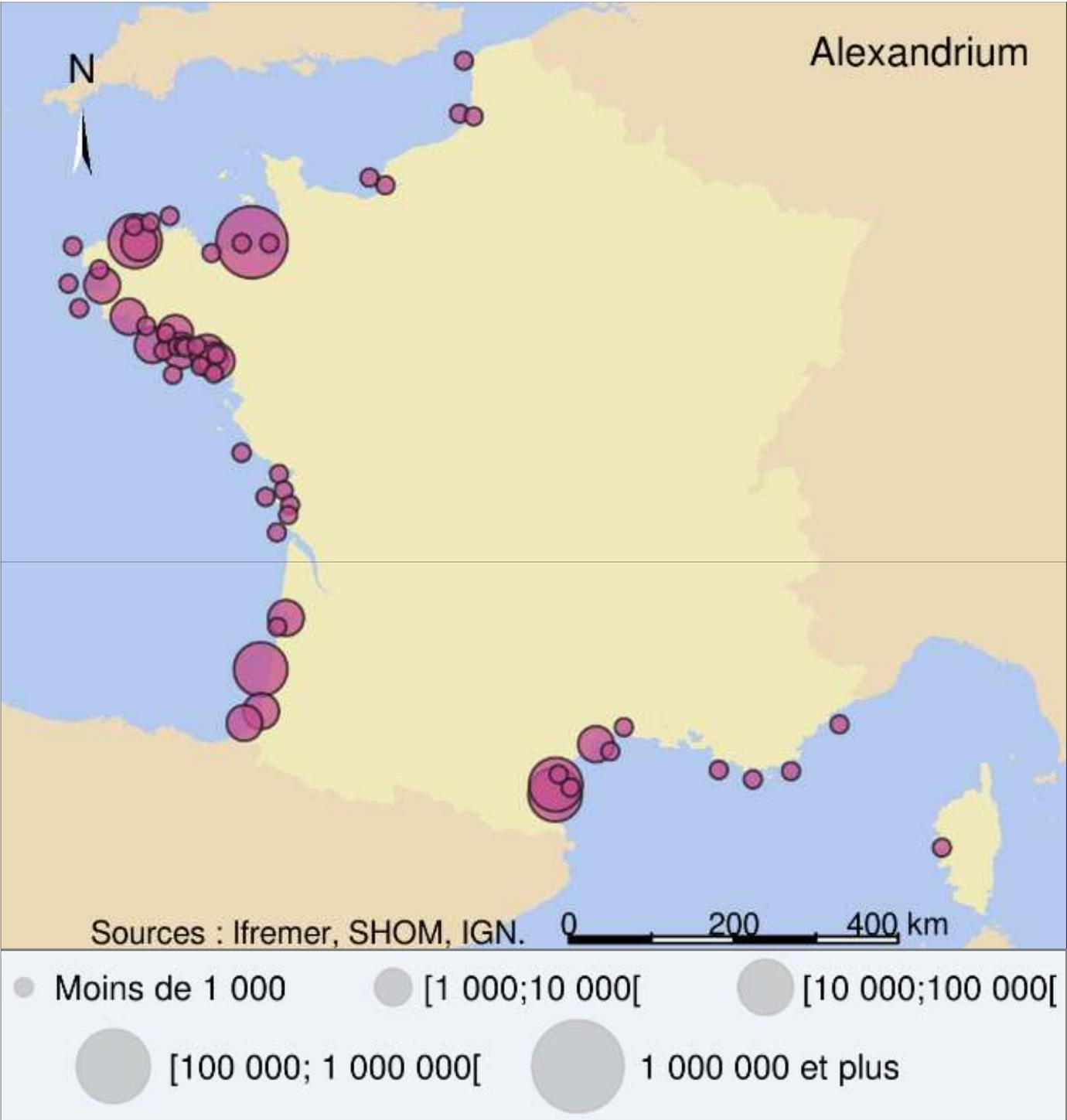


# Autres toxines – max annuels nationaux

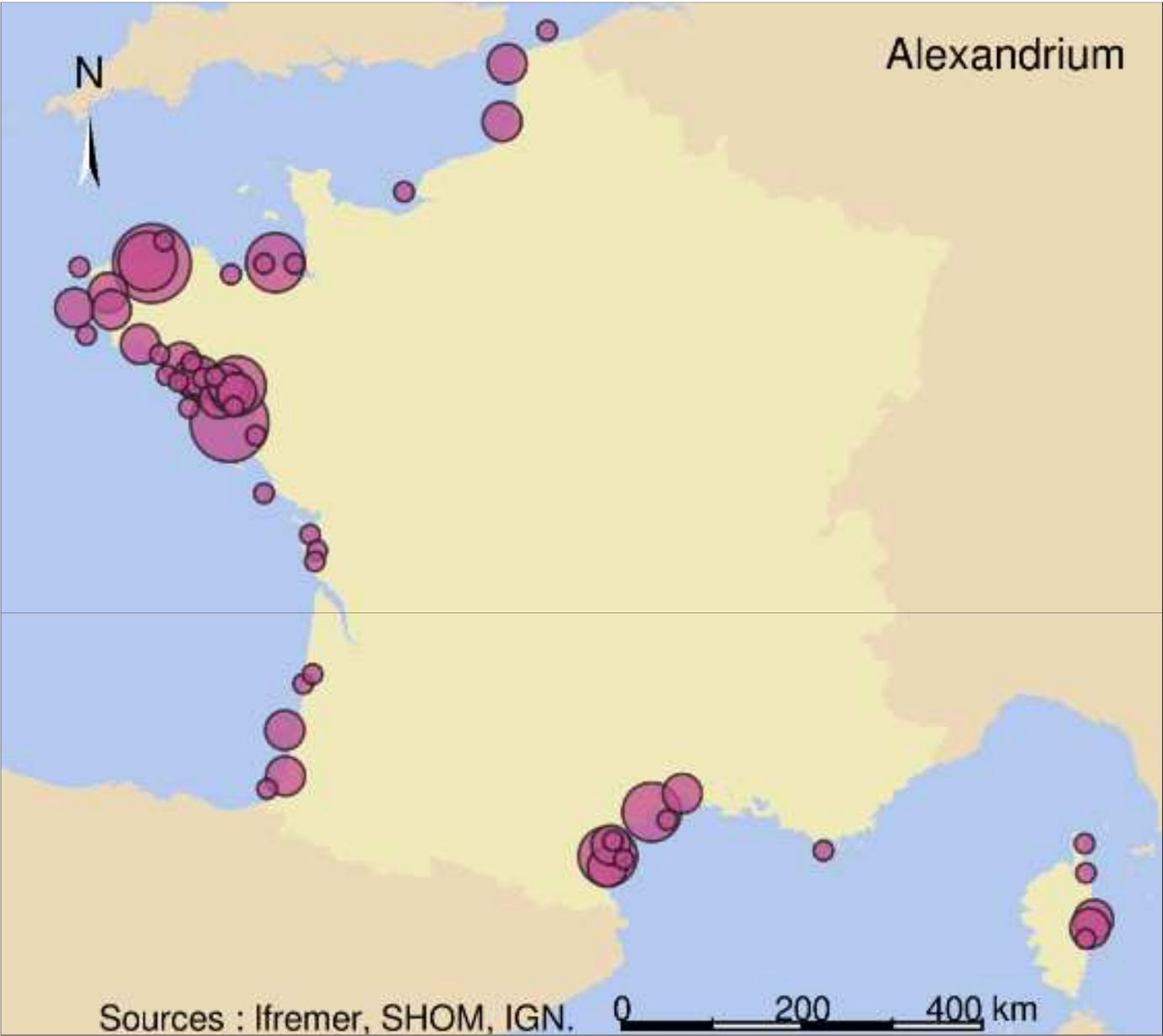
	2010	2011
GYM-A	24	15
GYM-B	2	15
SPX-desMe-C	61	41
SPX-A	14	13
SPX-desMe-D	18	10
SPX-B	2	10
SPX-C	31	15
SPX-D	21	12

*Alexandrium* et  
toxines paralysantes (PSP)

2009

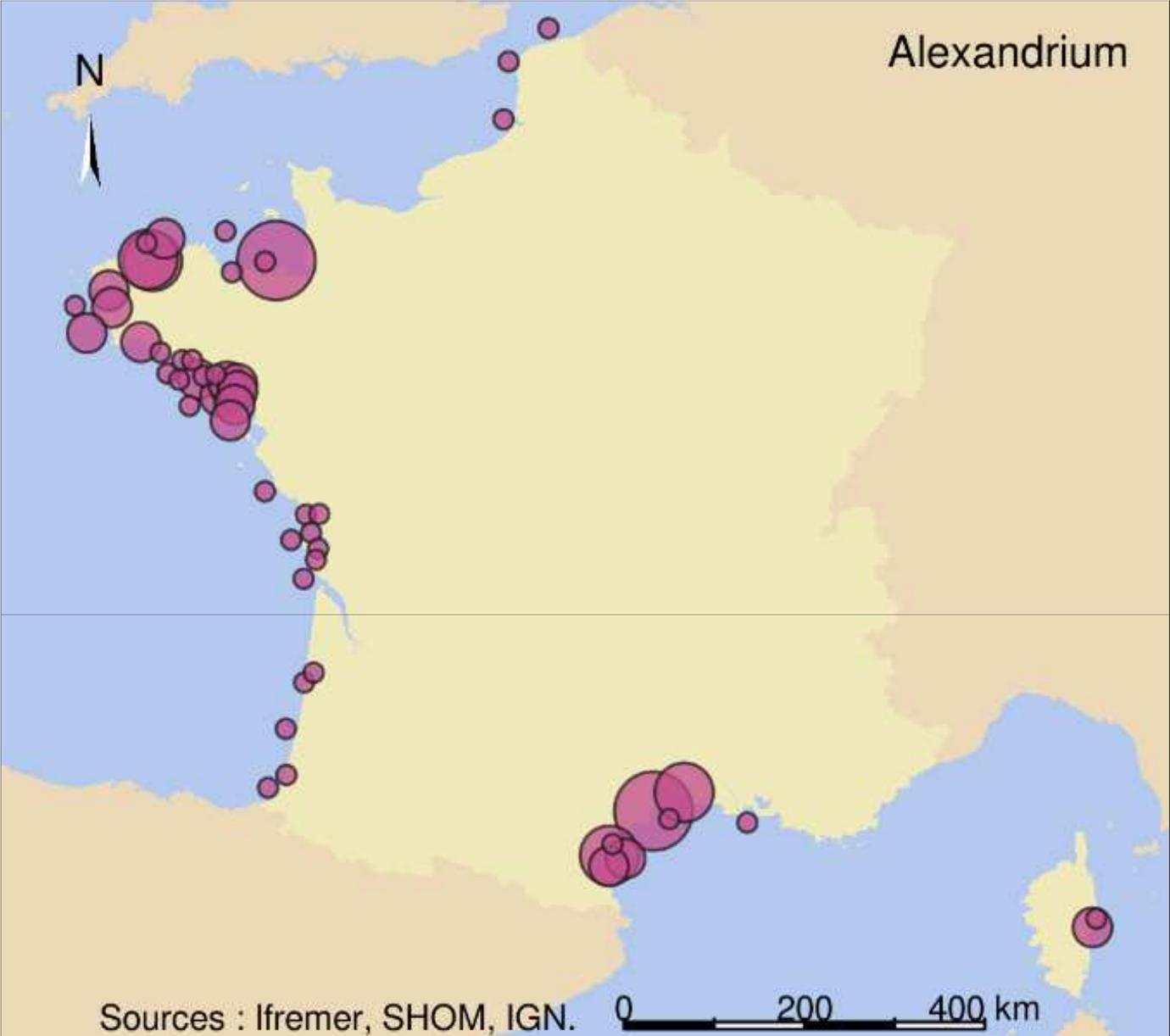


2010



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

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

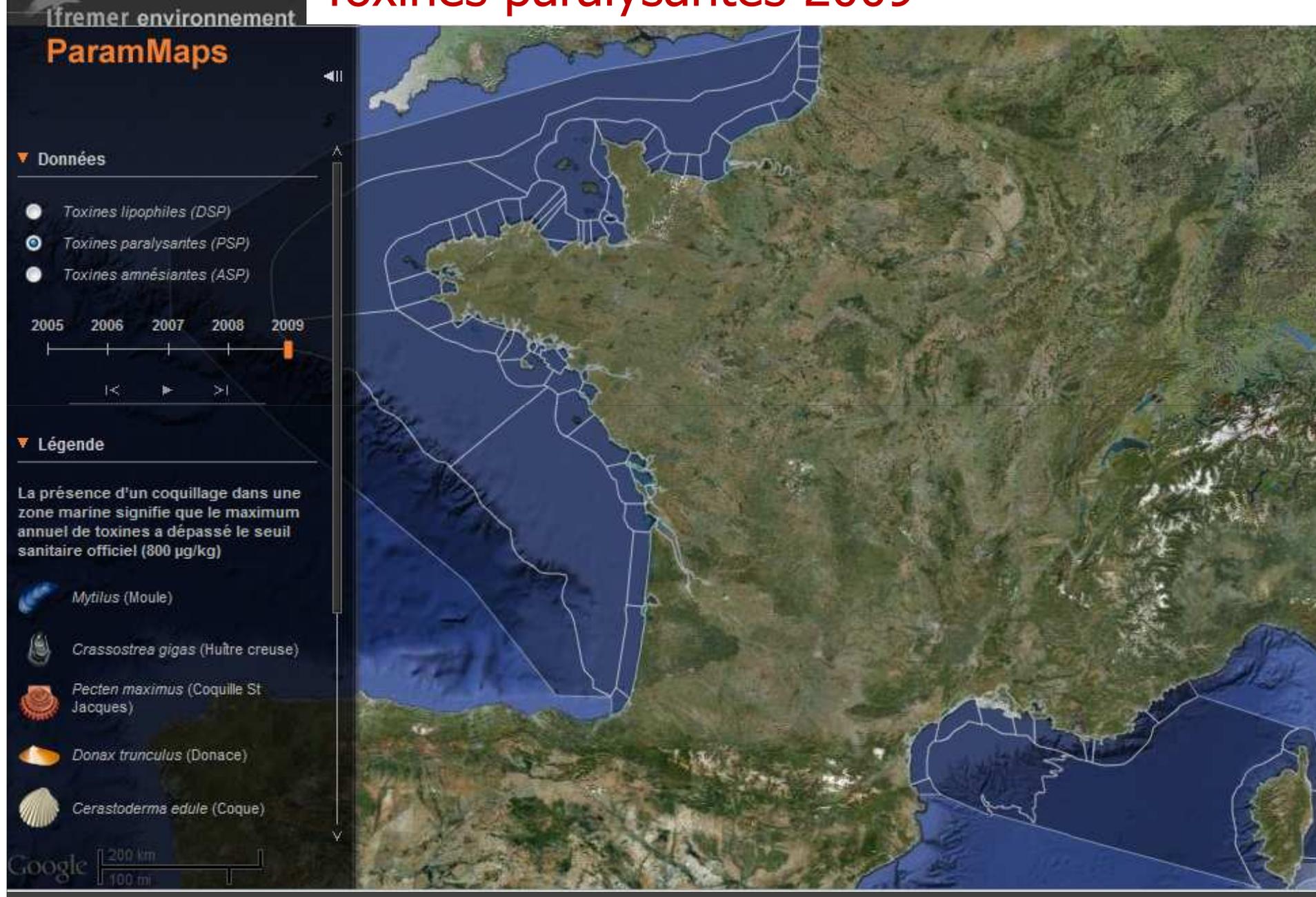


# Toxines PSP : rappel stratégie

---

- **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.....



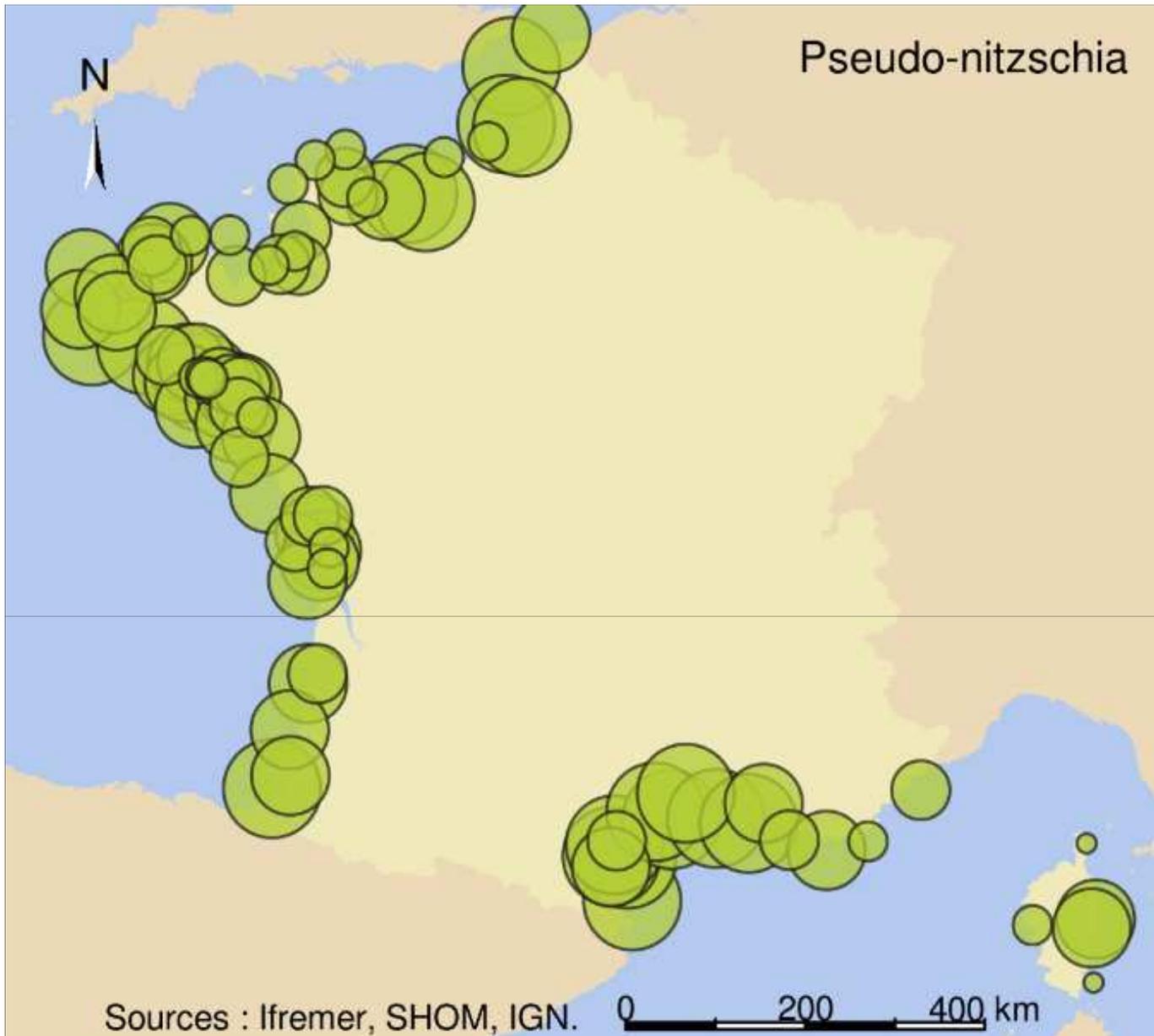
Carte 3°: Surveillance de la Rade de Brest - semaine 28 (8 au 14 juillet 2012)

Carte LER/Concarneau

*Pseudo-nitzschia* et  
toxines amnésiantes (ASP)

Pseudo-nitzschia

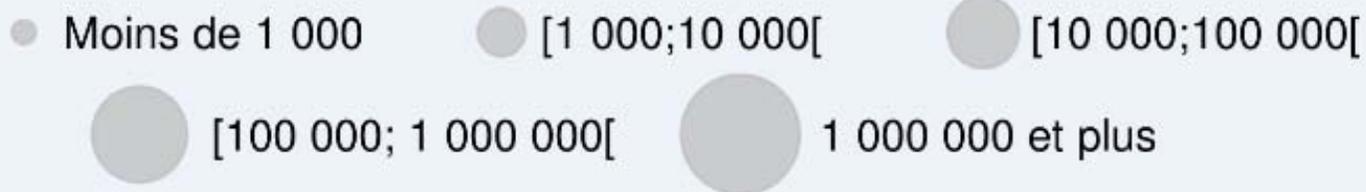
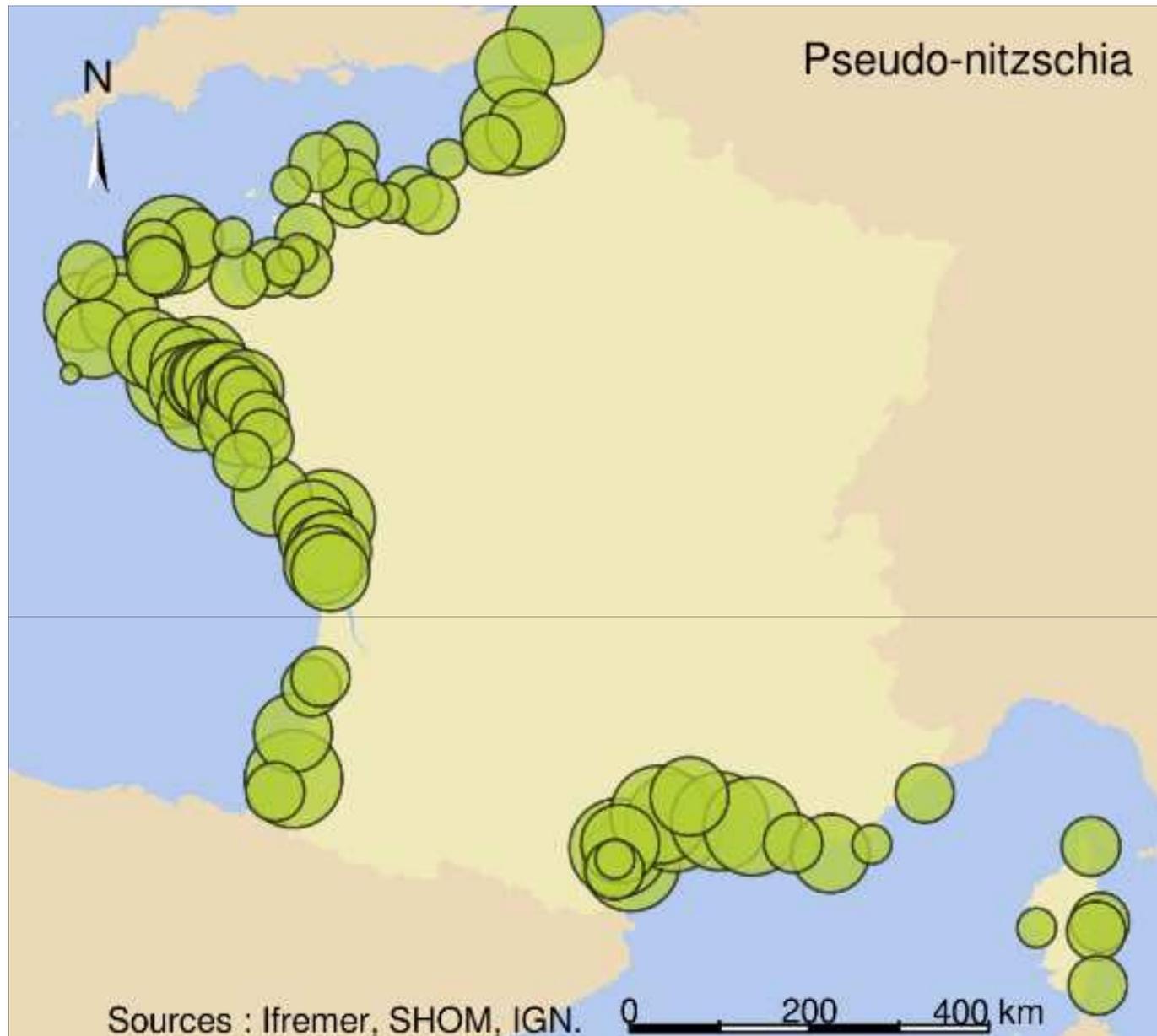
2009



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

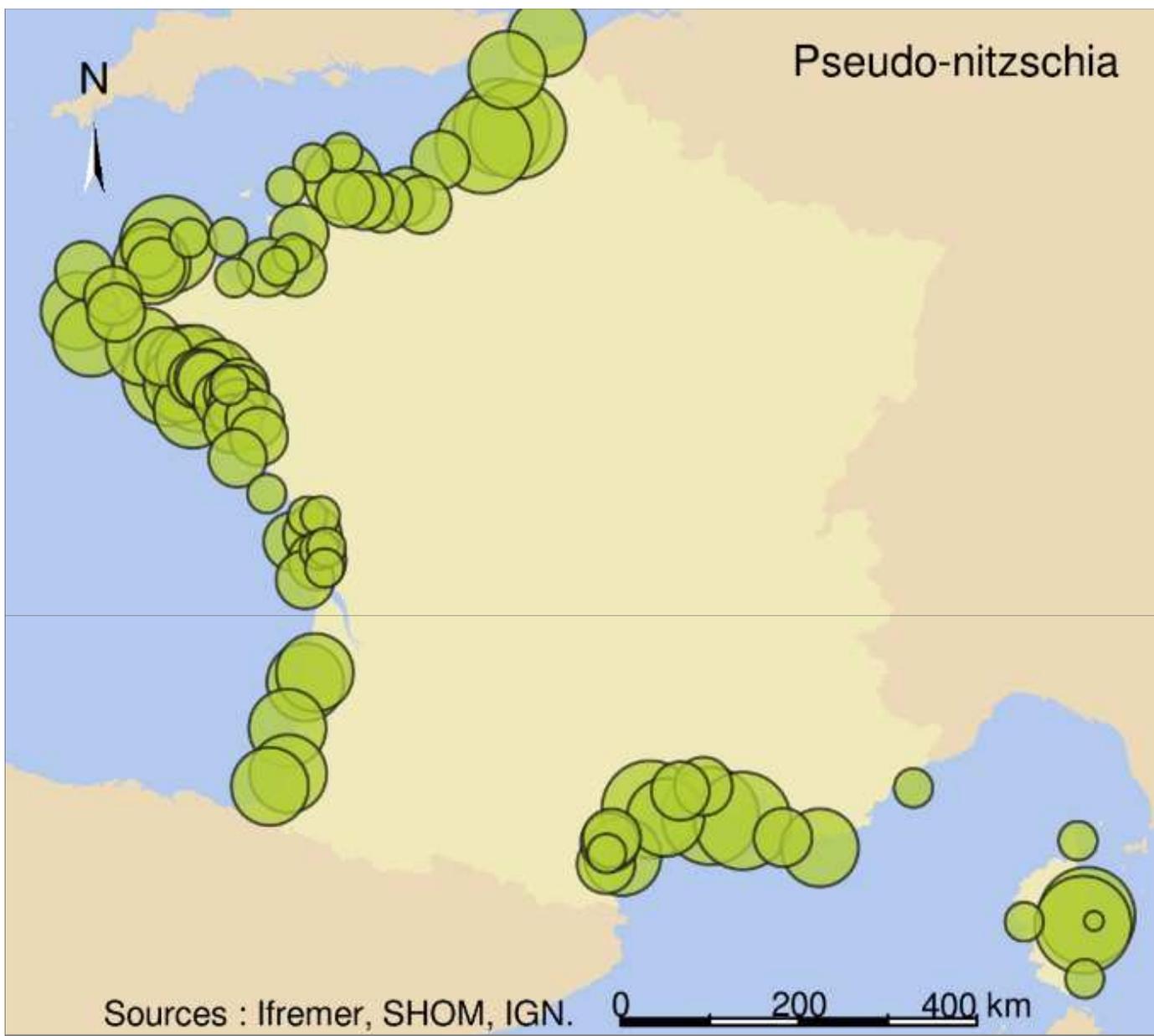
Pseudo-nitzschia

2010



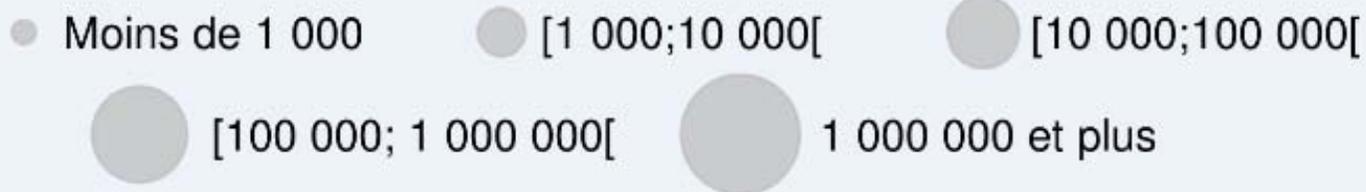
# Pseudo-nitzschia

# 2011



Sources : Ifremer, SHOM, IGN.

0 200 400 km





## *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

Ifremer environnement

ParamMaps

## Données

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

2005 2006 2007 2008 2009

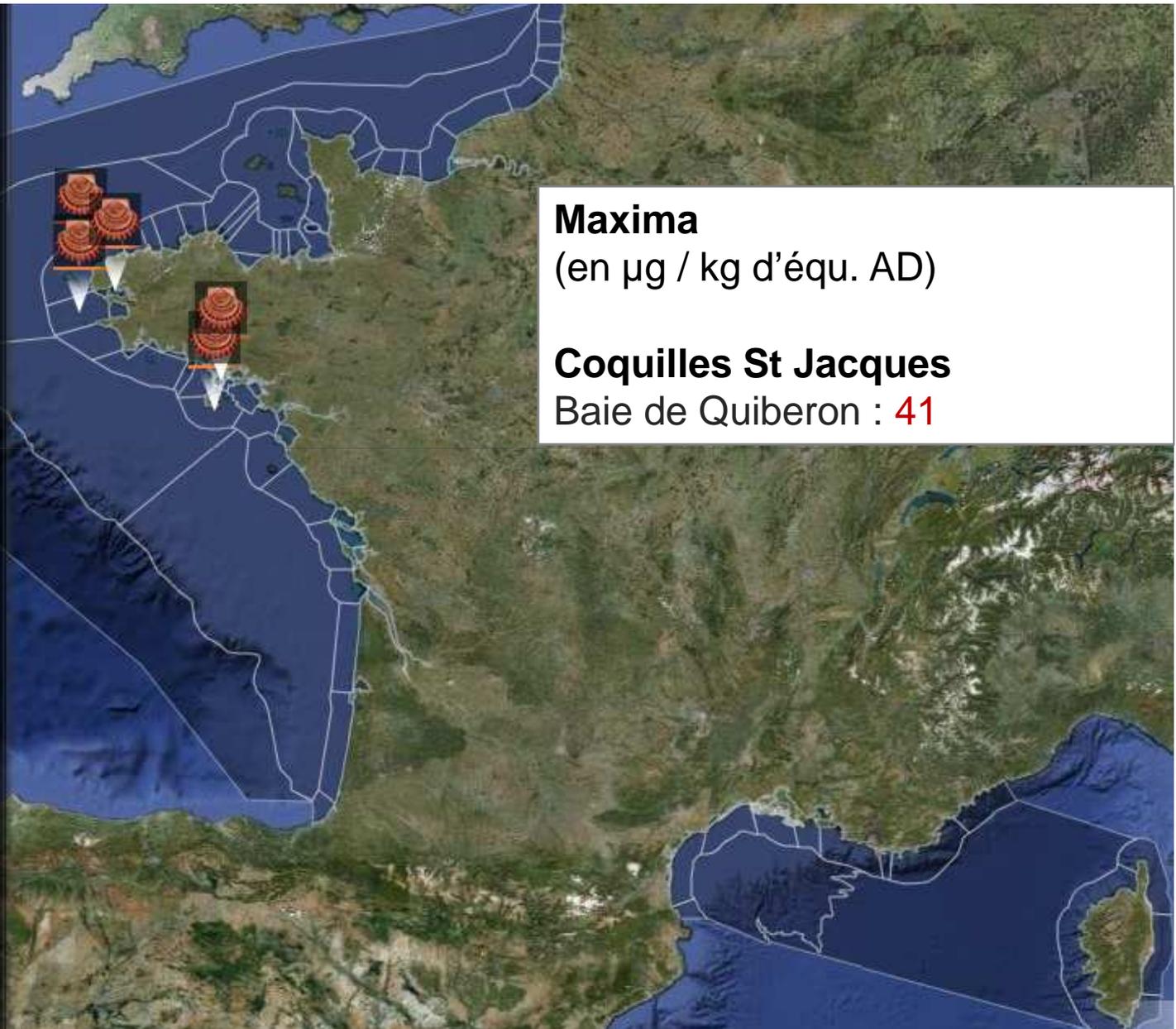
|< >|

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

**Coquilles St Jacques**

Belle île: 240

- moules
- huîtres
- palourdes
- pectinidés
- autres coquillages

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

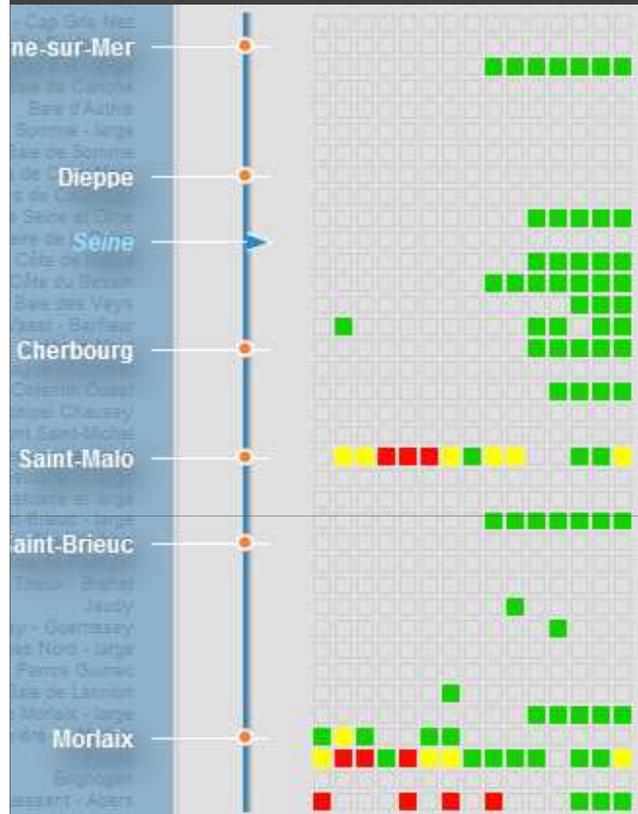
Toxines lipophiles, PSP et ASP

Evolution depuis 15 ans

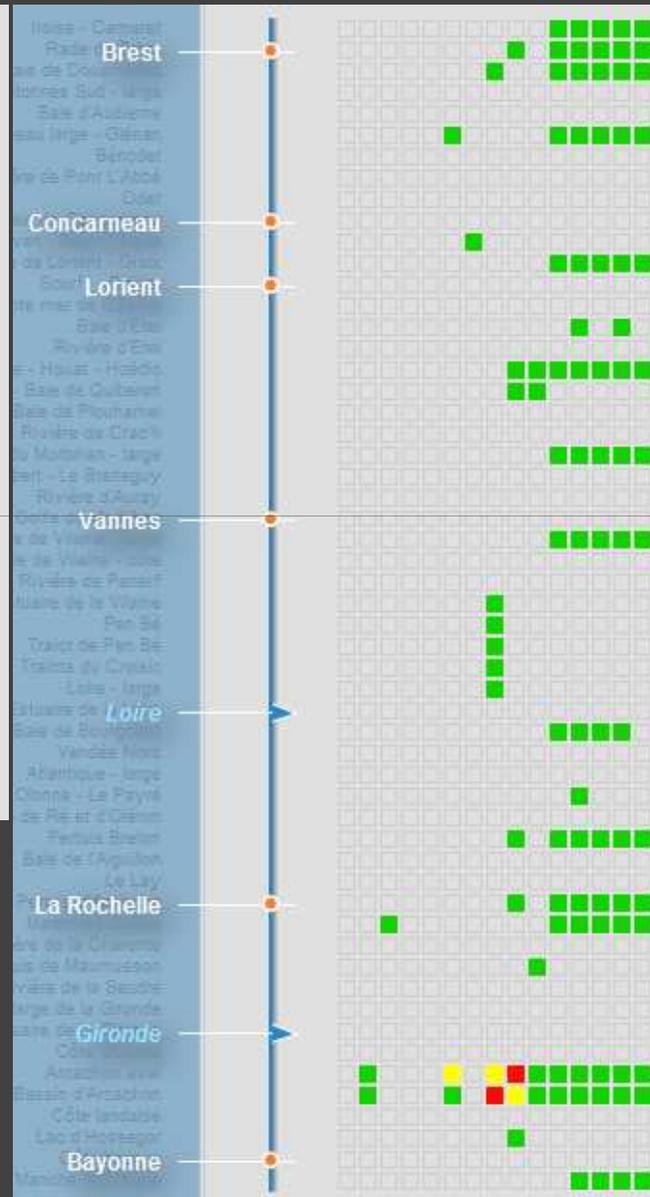


# Synoptique toxines paralysantes 1995 - 2009

## 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

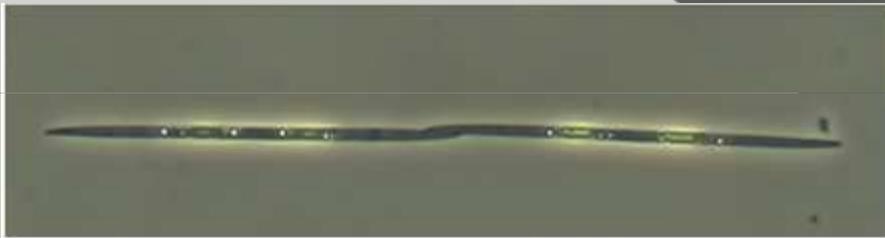


# L'identification de *Pseudo-nitzschia* spp.

Dans le cadre de  
la surveillance REPHY

2 grands groupes morphologiques  
distinguable en microscopie  
optique :

*P. delicatissima* complex



< 3 µm

*P. seriata* complex

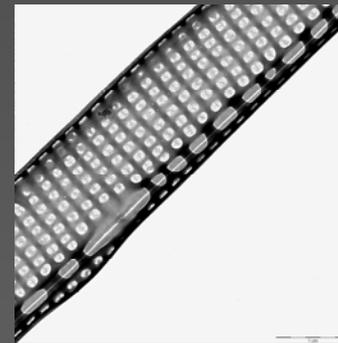


> 3 µm

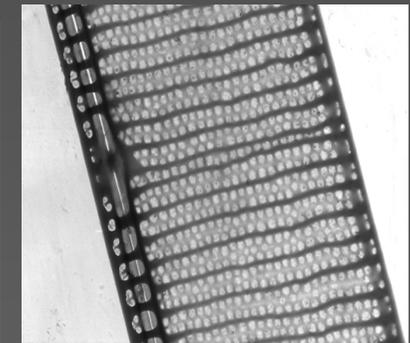


Espèces distinguables en  
microscopie électronique !

*P. pseudodelicatissima*



*P. fraudulenta*



Ou

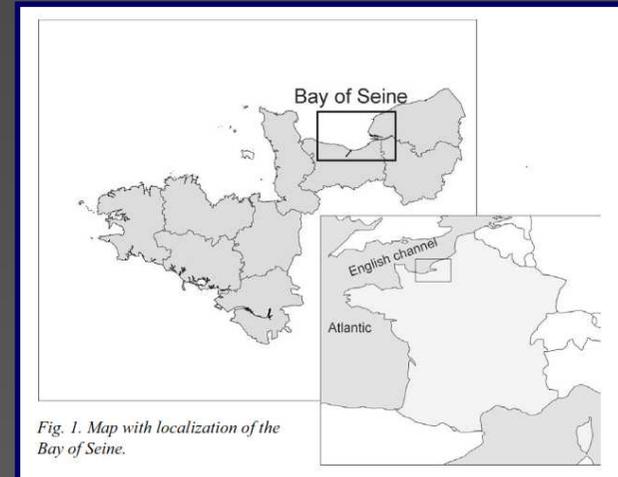
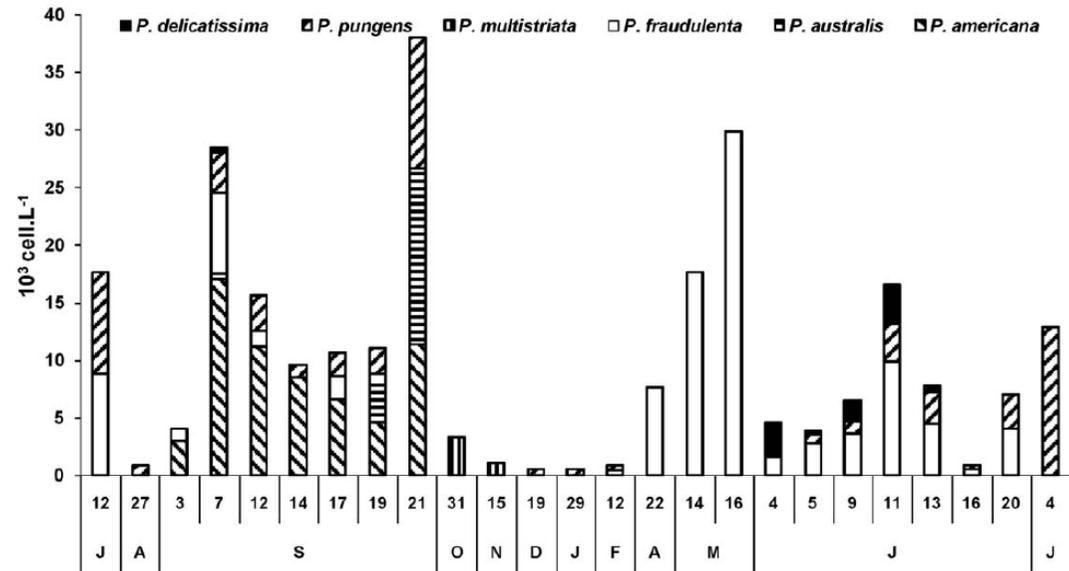
avec des méthodes  
génétiques



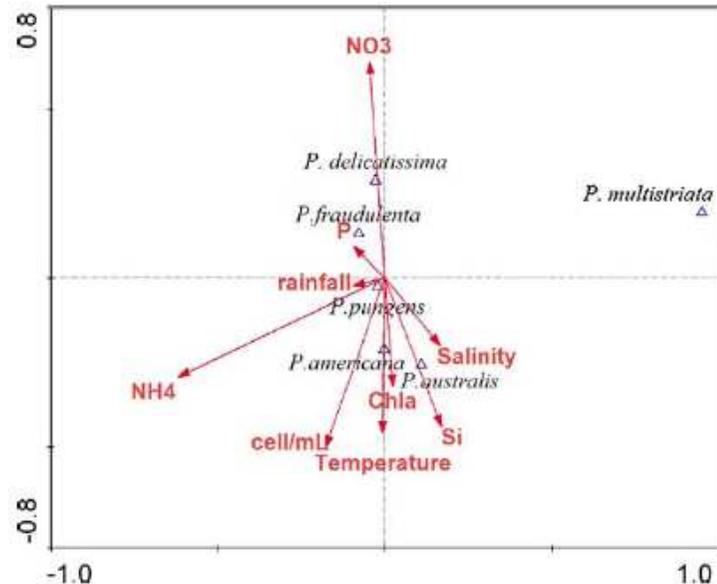
## BIOLOGIE MOLECULAIRE

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

# Pourquoi identifier les espèces ?



(Klein et al., 2010)

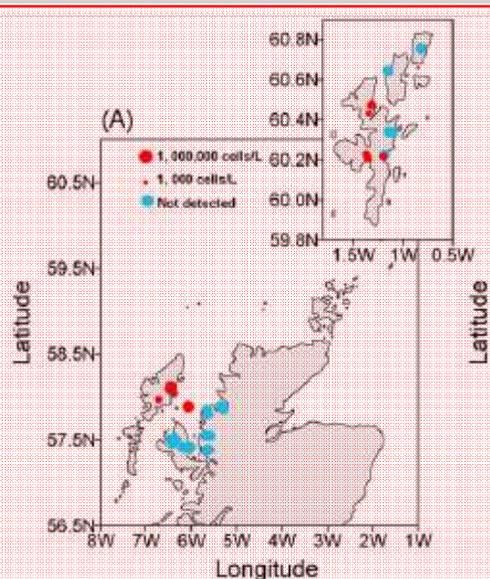
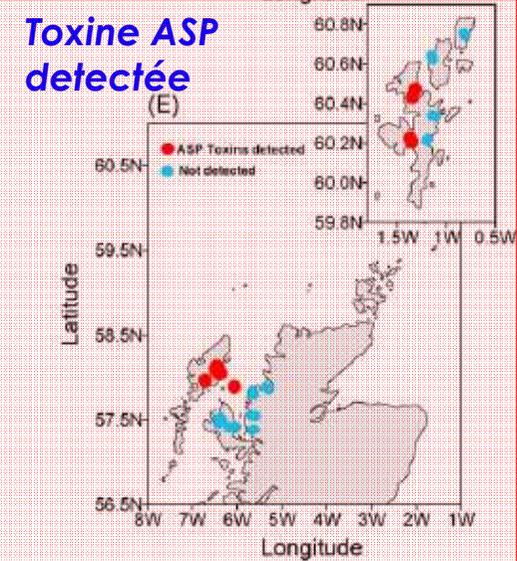
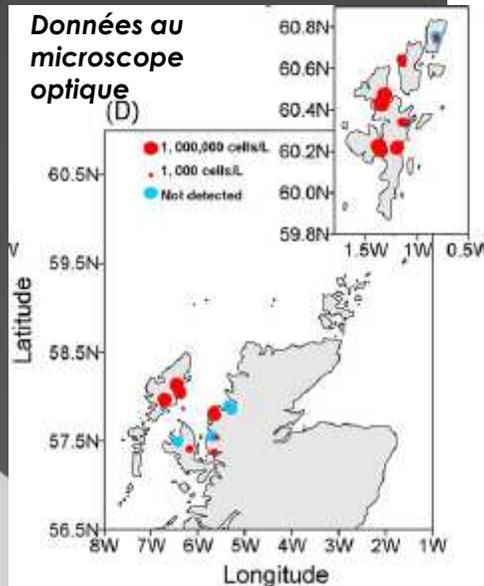


- Les espèces ne sont pas ubiquitaires
- Elles ont des saisonnalités différentes
- Leur importance relative varie très rapidement
- Elles répondent différemment aux variables environnementales

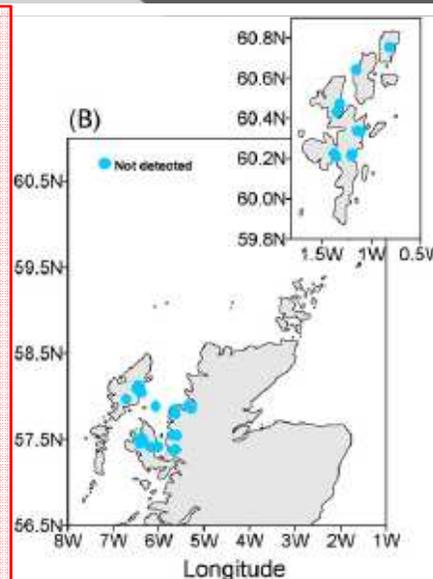
# Pourquoi identifier les espèces ?

Nous pouvons associer  
une espèce à un  
évènement toxique

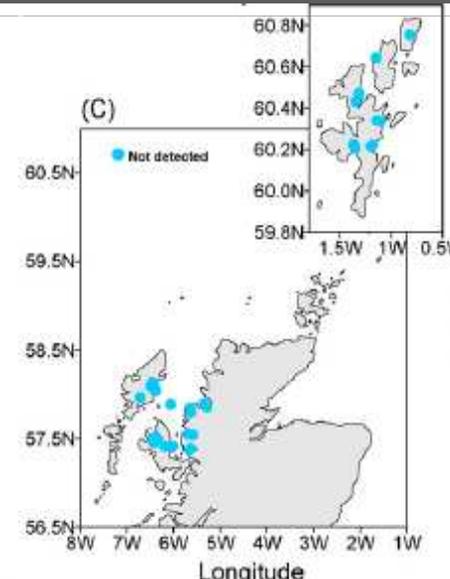
Méthode:  
Fluorescent In Situ  
Hybridization



Sondes: *P. australis*



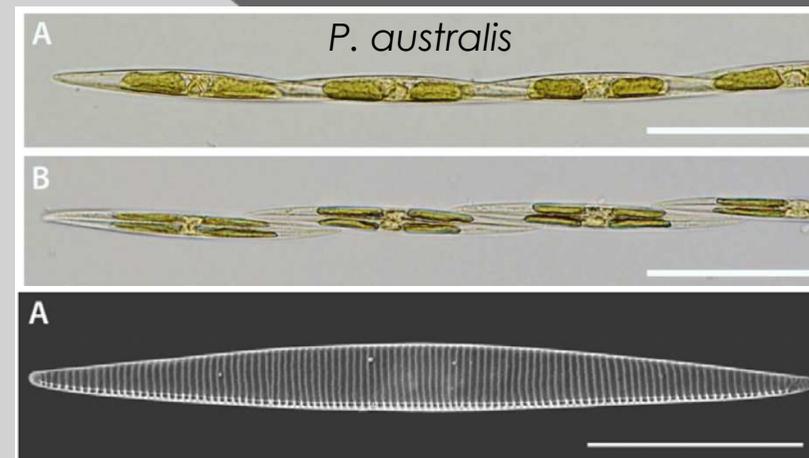
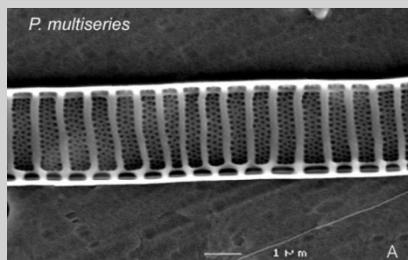
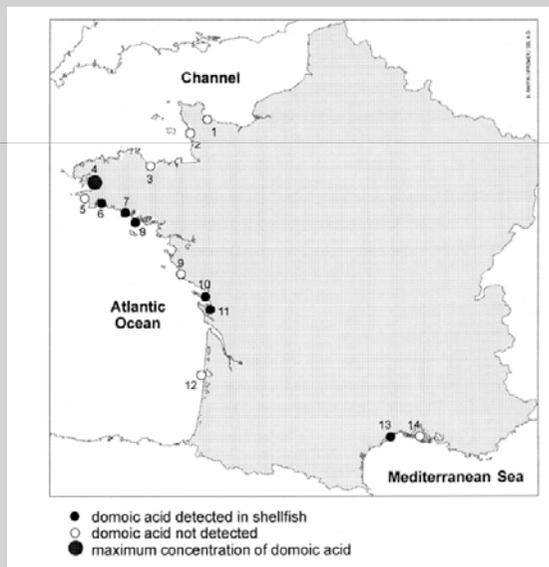
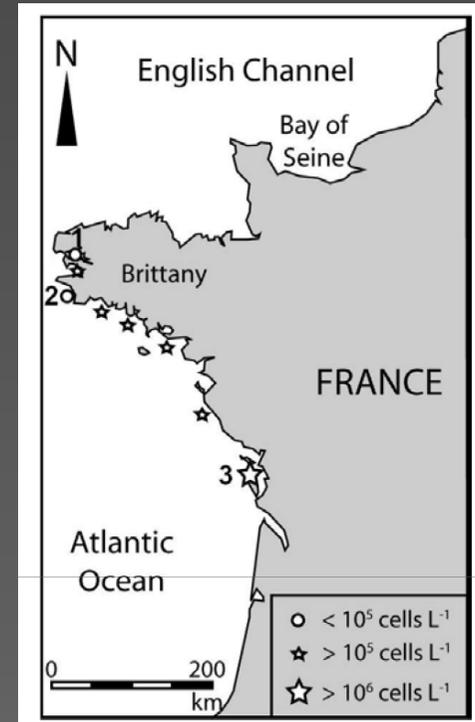
*P. fraudulenta*



*P. delicatissima* (deD1)

# Contamination et espèces en Bretagne

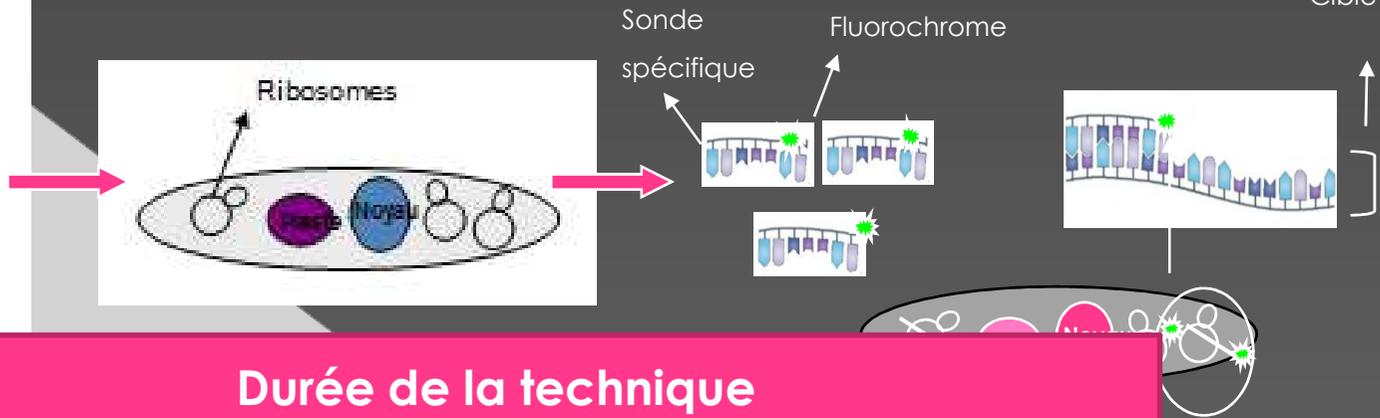
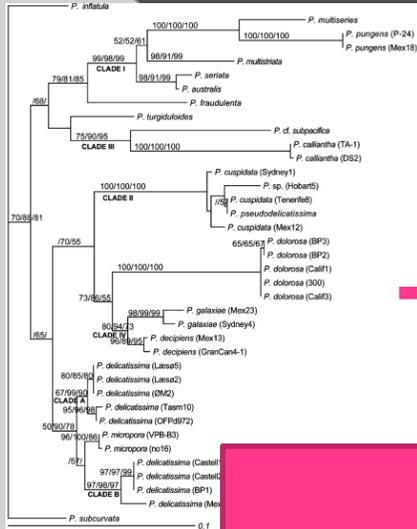
- *P. calliantha* (avant 2000) (données IFREMER)
- *P. multiseriis* (1999-2000) (Amzil et al., 2001)
- *P. australis* (à partir 2005) (Nezan et al., 2010)



# 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 de la sonde sur la base de la phylogénie

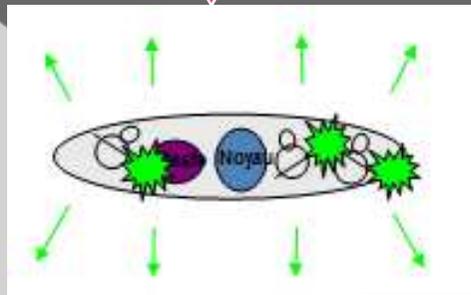
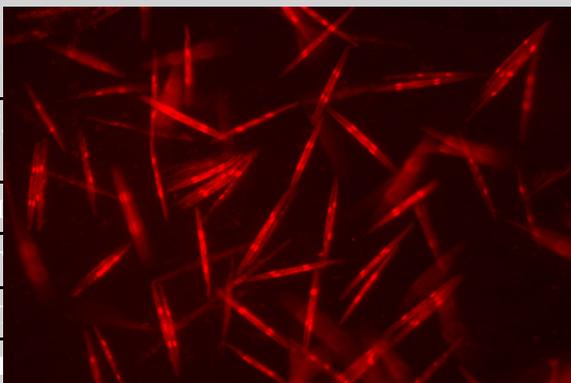
**Durée de la technique**

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

2. Préparation de l'échantillon

Sondes	Séquence (5' à 3')	Spécificité
D2C	5'-FITC-CCTTGGTCCGTT-3'	
Paustralis53R	5'-Cy3-CAAGACAGGTT-3'	
Pmultiseriens2	5'-Cy3-ATGACTCACTC-3'	
Ppungens	5'-FITC-ATGACTCACTC-3'	
Pfraudulenta3	5'-FITC-CCGAAGCCAGAGTGCCACGCAAATC-FITC-3'	<i>P. fraudulenta</i>
Pdelicatissima	5'-Cy3-AGAGGCAGTCAAGGCCAAAGCAACC-3'	<i>P. delicatissima</i>

5. Détection des cellules marquées

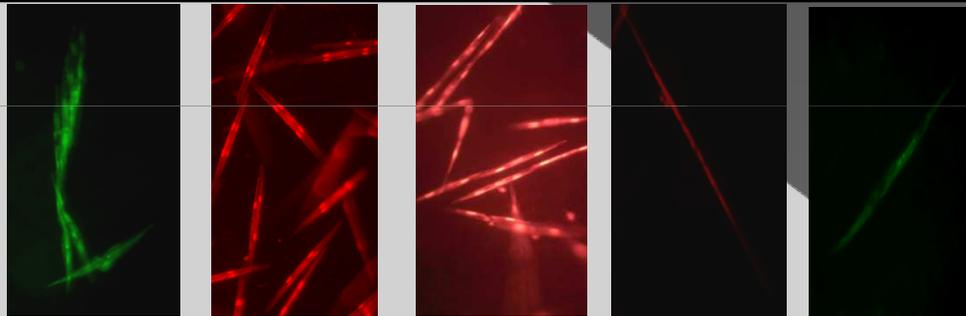


4. Emission du signal sous microscope à épifluorescence

# Développement de la technique FISH

## Mise au point de la technique sur des cultures

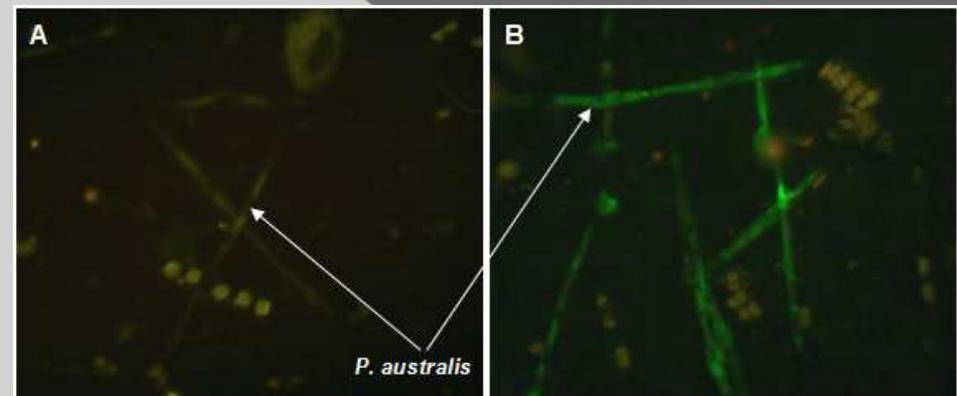
Sondes Espèces	D2C (universelle)	Pdelicatissima	Paustralis53R	Pmultiseries2	Ppungens	Pfraudenta3
<i>P. multiseries</i>	2++	-	-	++	-	-
<i>P. pungens</i>	++	+	+	-	++	-
<i>P. australis</i>	++	-	+++	-	-	-
<i>P. fraudulenta</i>	++	-	-	-	-	-
<i>P. delicatissima</i>	++	+++	+	-	-	-



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



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



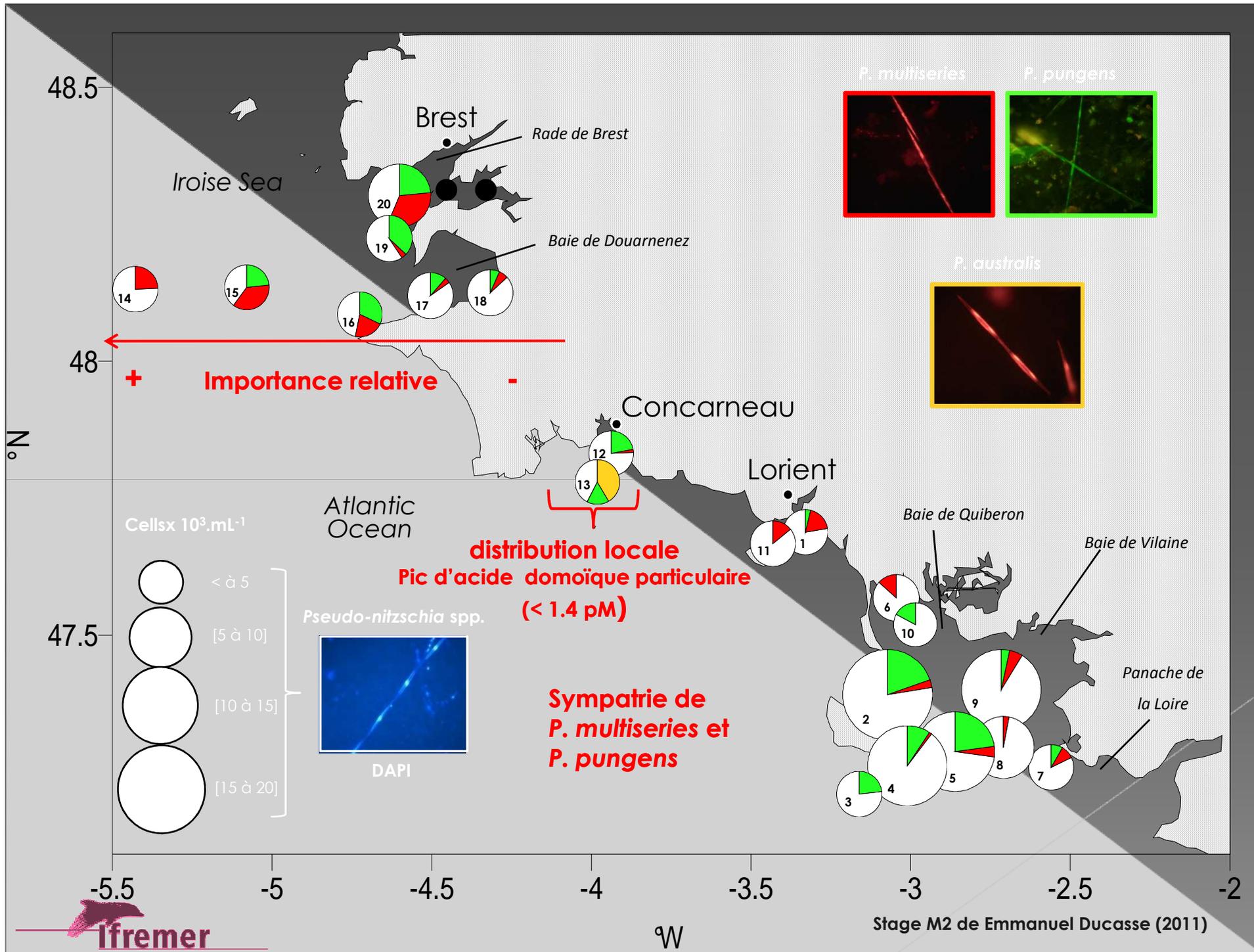
# Dynamique spatiale

## Campagne océanographique PSEUTEC (9-16 Juin 2011)

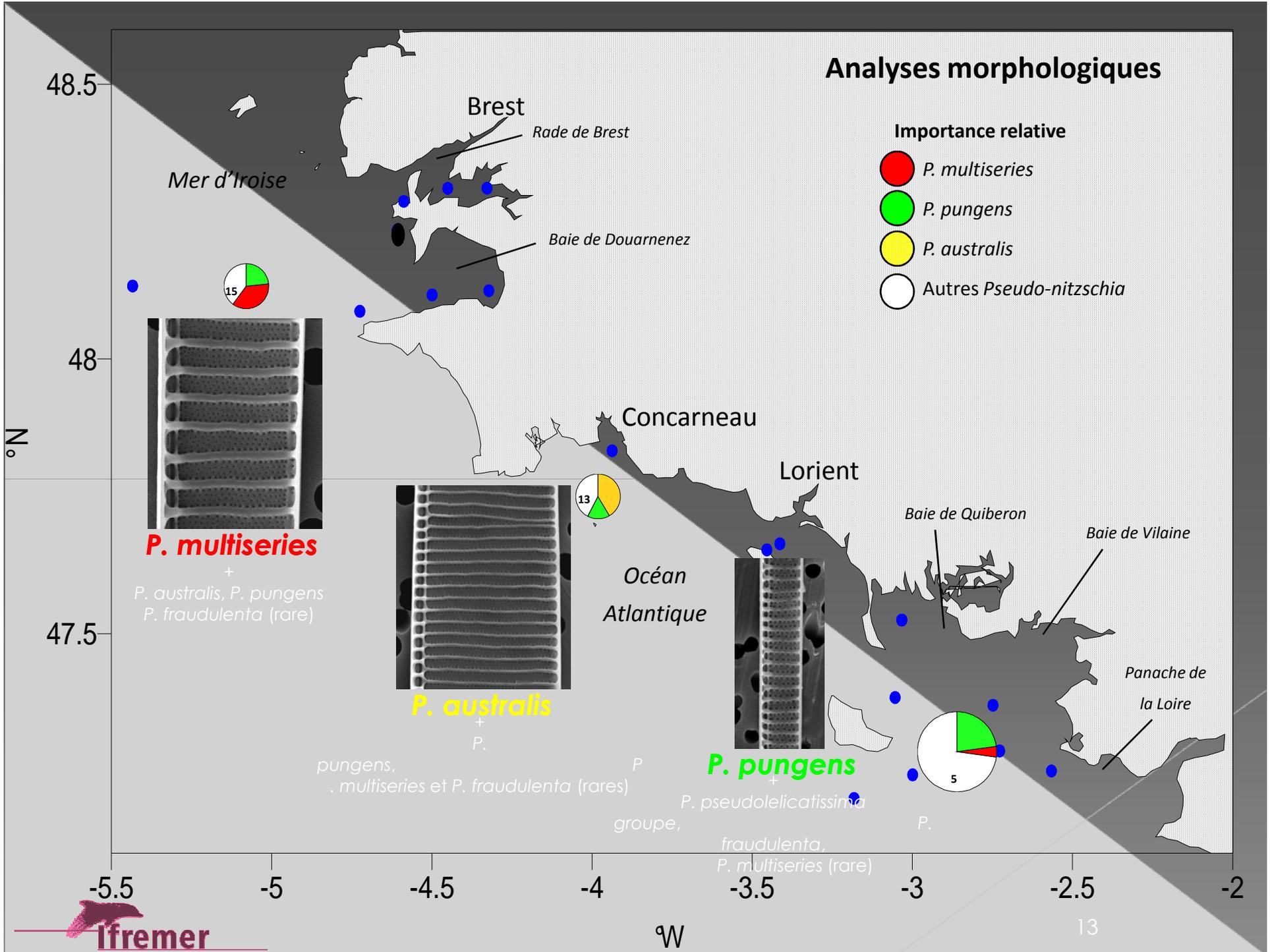
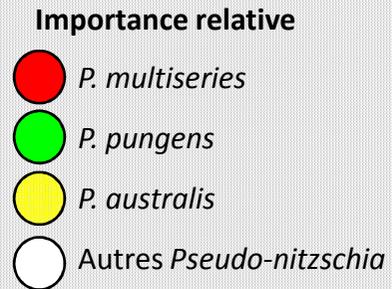
- Aire d'étude : Bretagne Sud et Mer d'Iroise.
- Echantillonnage : Bouteilles Niskin (comptage MO).  
Traits de filets verticaux (FISH).
- Mesures des paramètres hydrologiques : Fluorescence, Température, salinité, sels nutritifs







# Analyses morphologiques



***P. multiseriis***

+  
*P. australis*, *P. pungens*  
*P. fraudulenta* (rare)

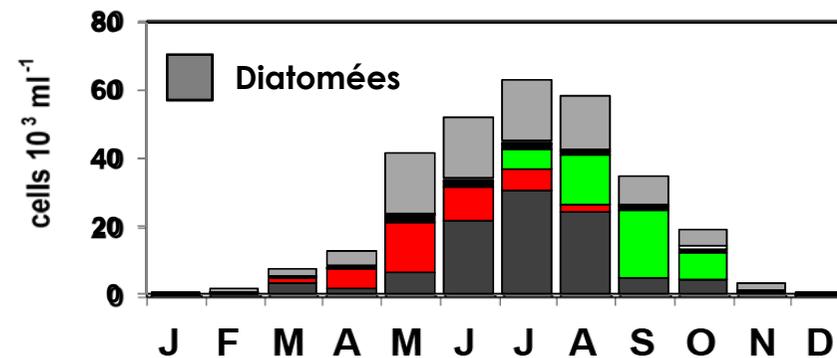
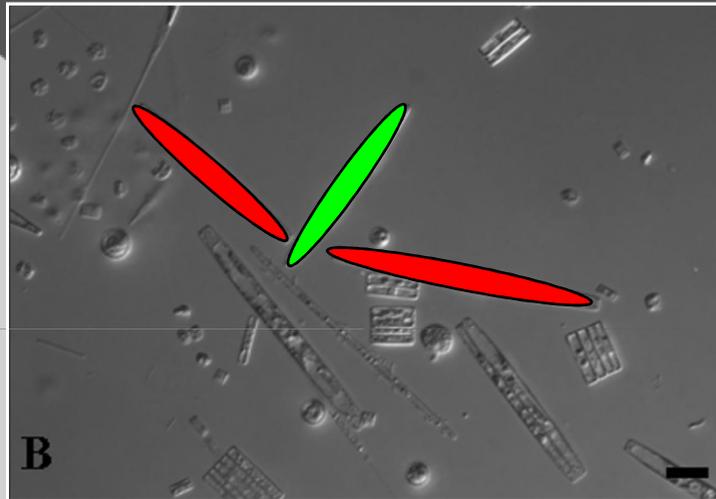
***P. australis***

+  
*P. pungens*,  
*P. multiseriis* et *P. fraudulenta* (rares)

***P. pungens***

+  
*P. pseudoleicatissima*  
*P. fraudulenta*,  
*P. multiseriis* (rare)

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,  $\mu\text{m}$ )
- cultures

➤ Traits de filet

0-20 m

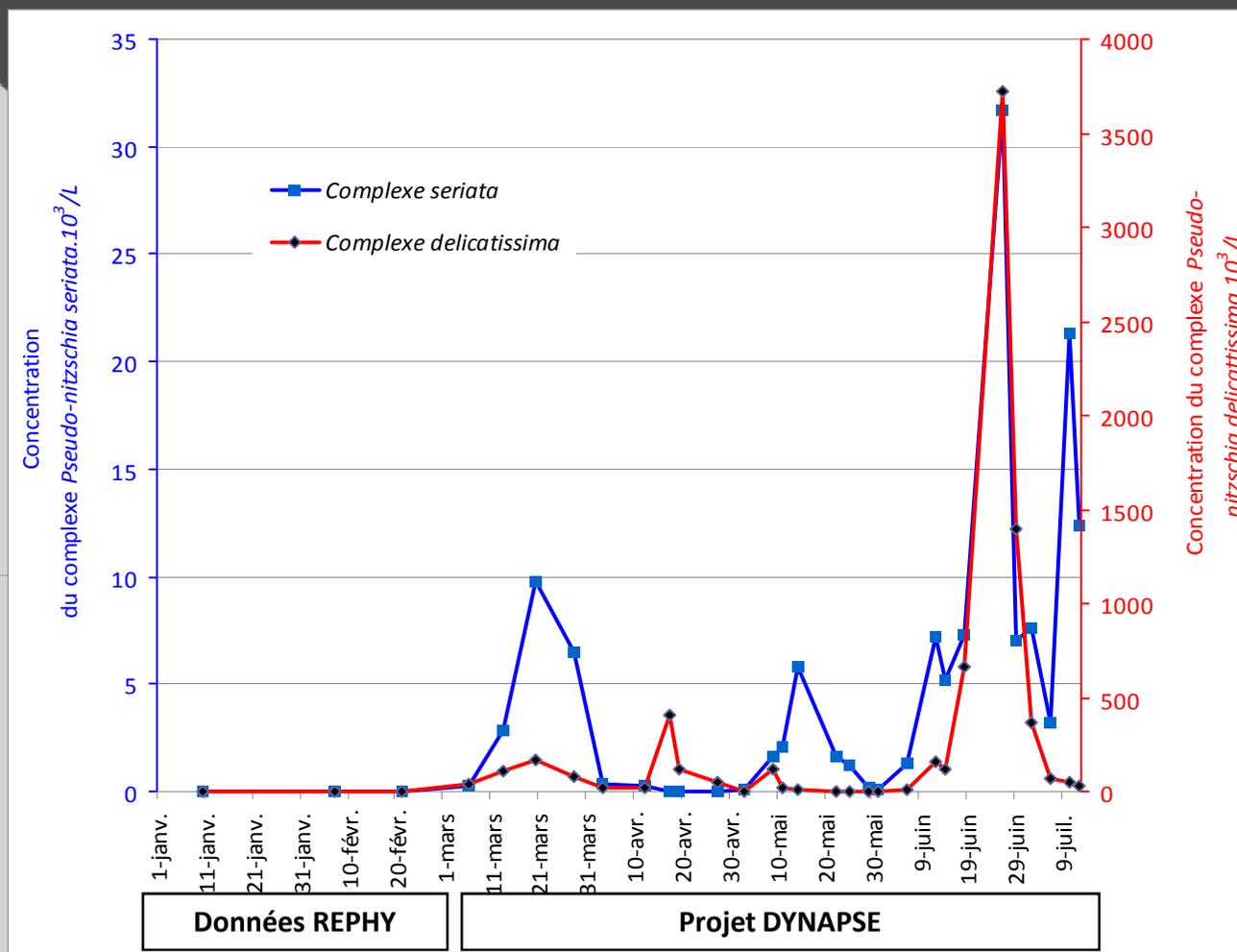
- FISH



LER  
CONCARNEAU



# Dynamique temporelle

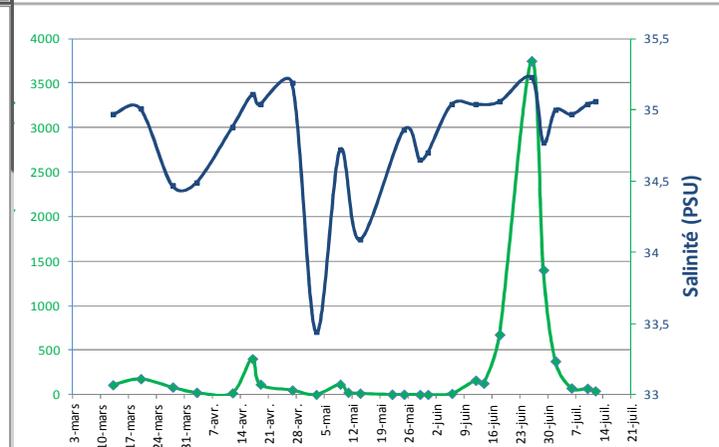
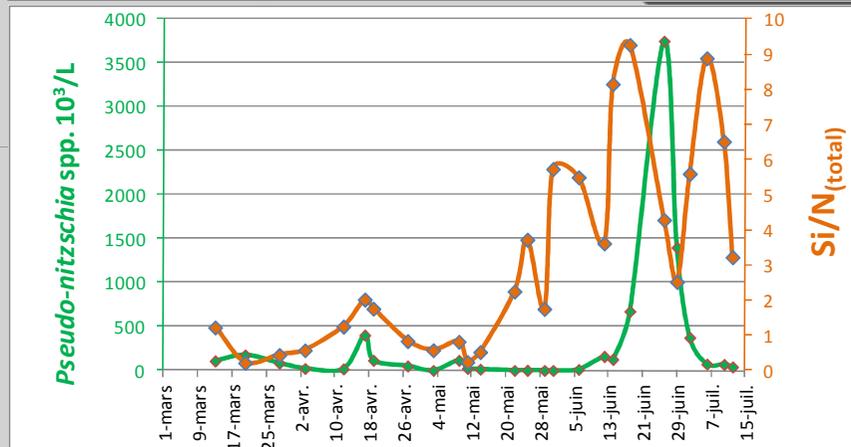
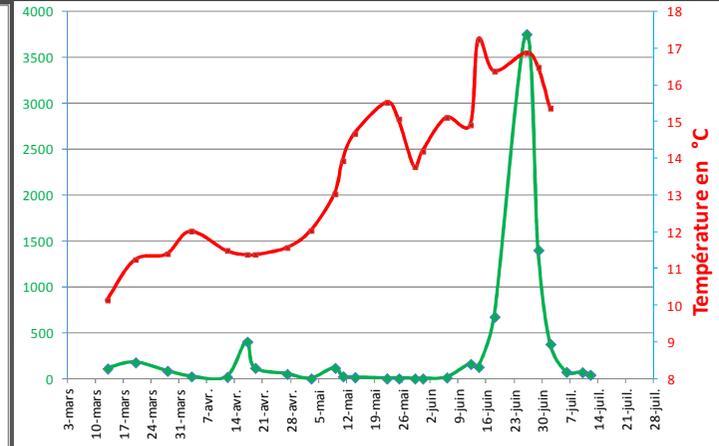
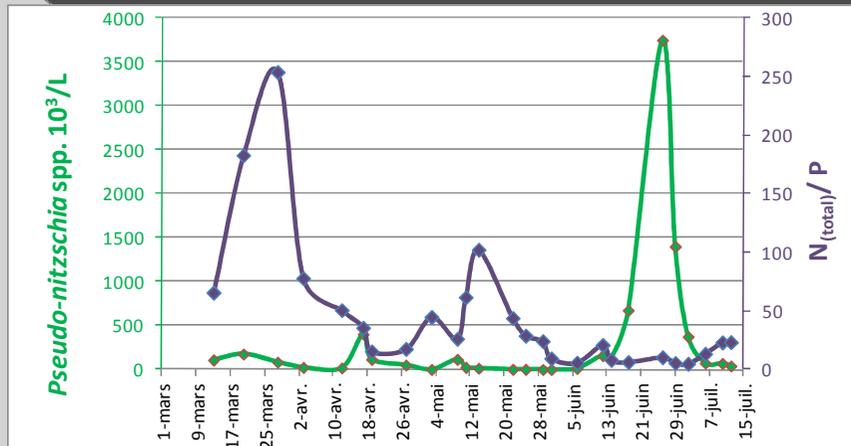


- Dominance du complexe  
*P. delicatissima*

- 2 périodes d'efflorescence du complexe  
*P. delicatissima*

3 périodes d'efflorescence du complexe  
*P. seriata*

# Efflorescences et facteurs abiotiques



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



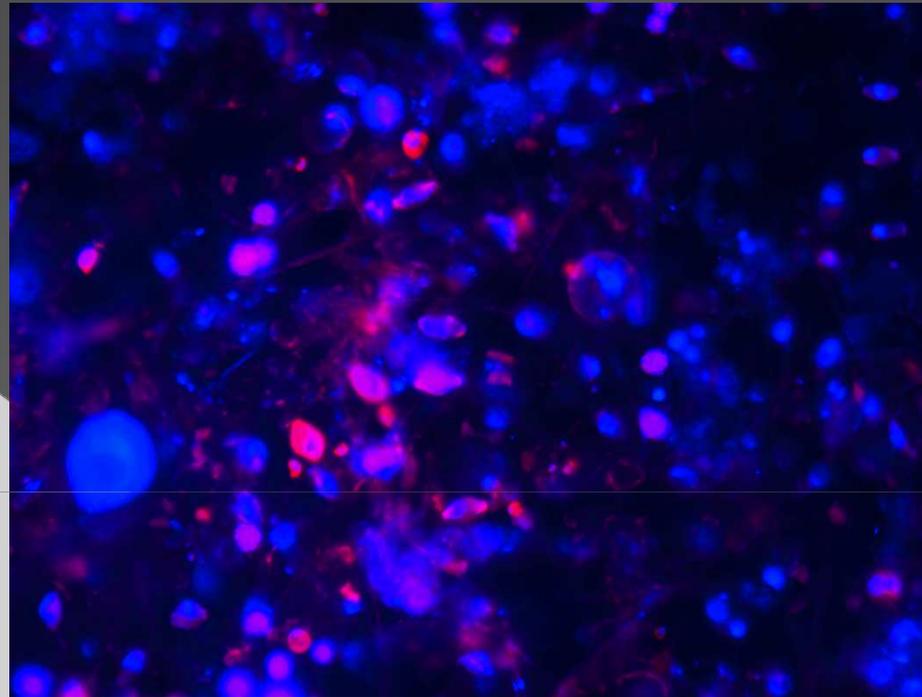
Bloom à 17°C

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*

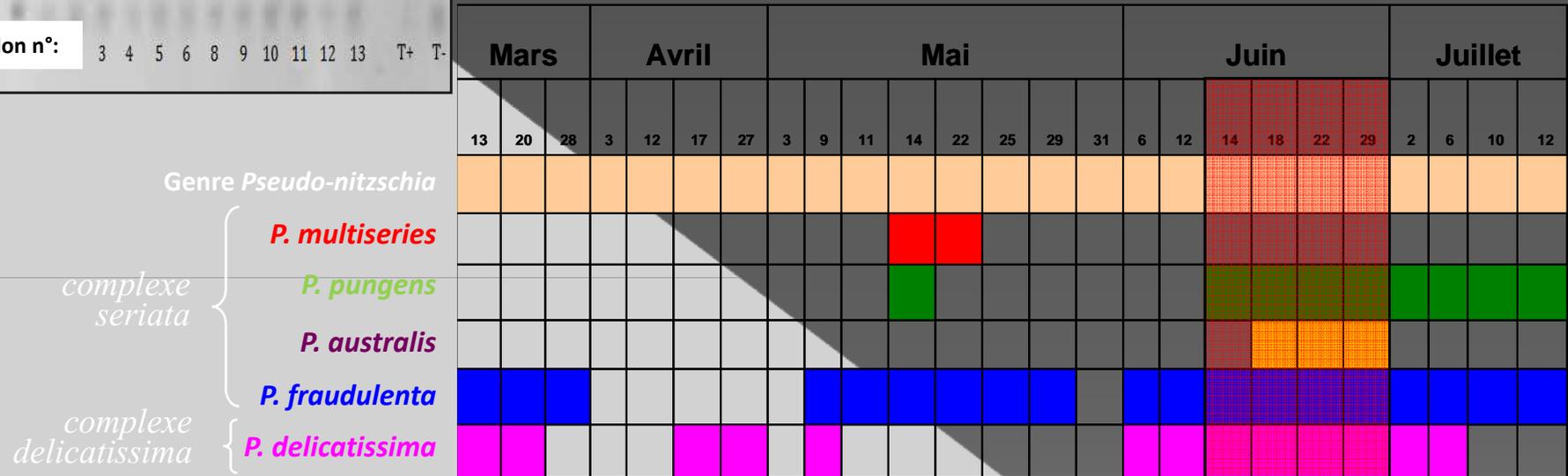
**Il faut adapter la technique au type d' écosystème étudié**

# Identification des espèces avec PCR spécifiques

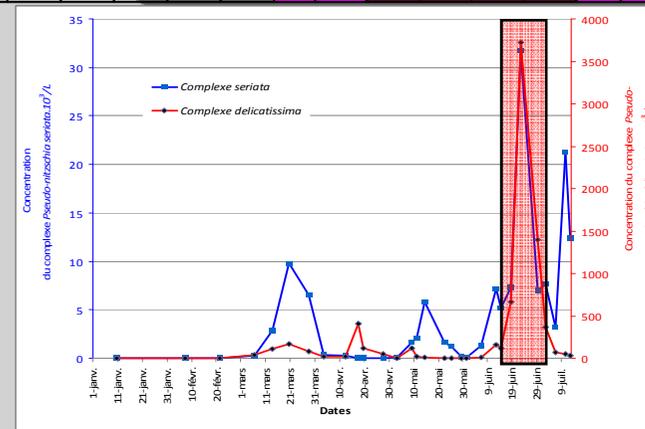


Développement des amorces spécifiques ciblant la région ITS r-DNA

**Durée de la technique**  
1 journée d'analyse



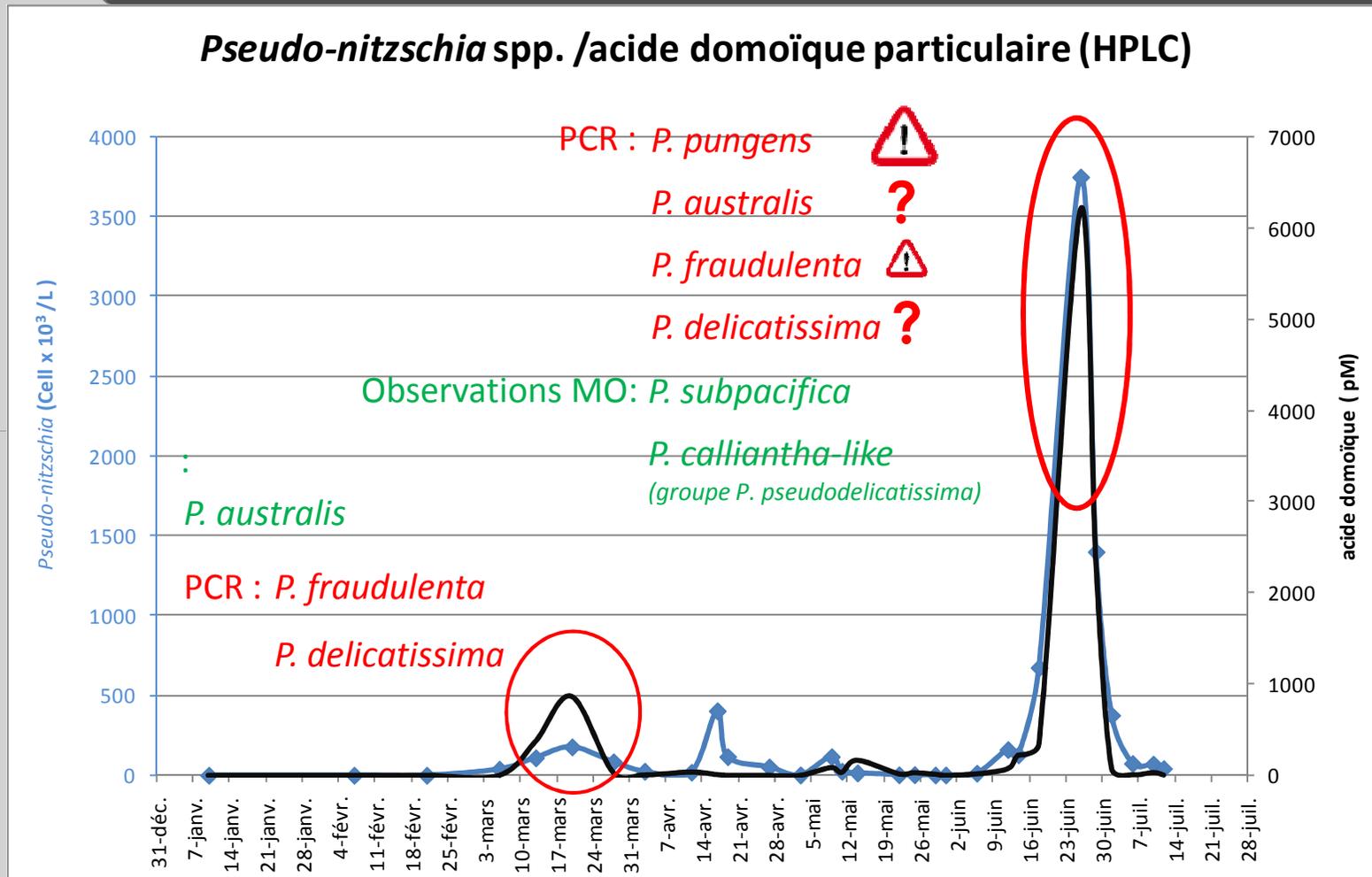
- Aucune espèce n'a la même phénologie
- Juin majeure biodiversité
- *P. pungens* et *P. multiseriis* morphologies très proches mais phénologie différente



# 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



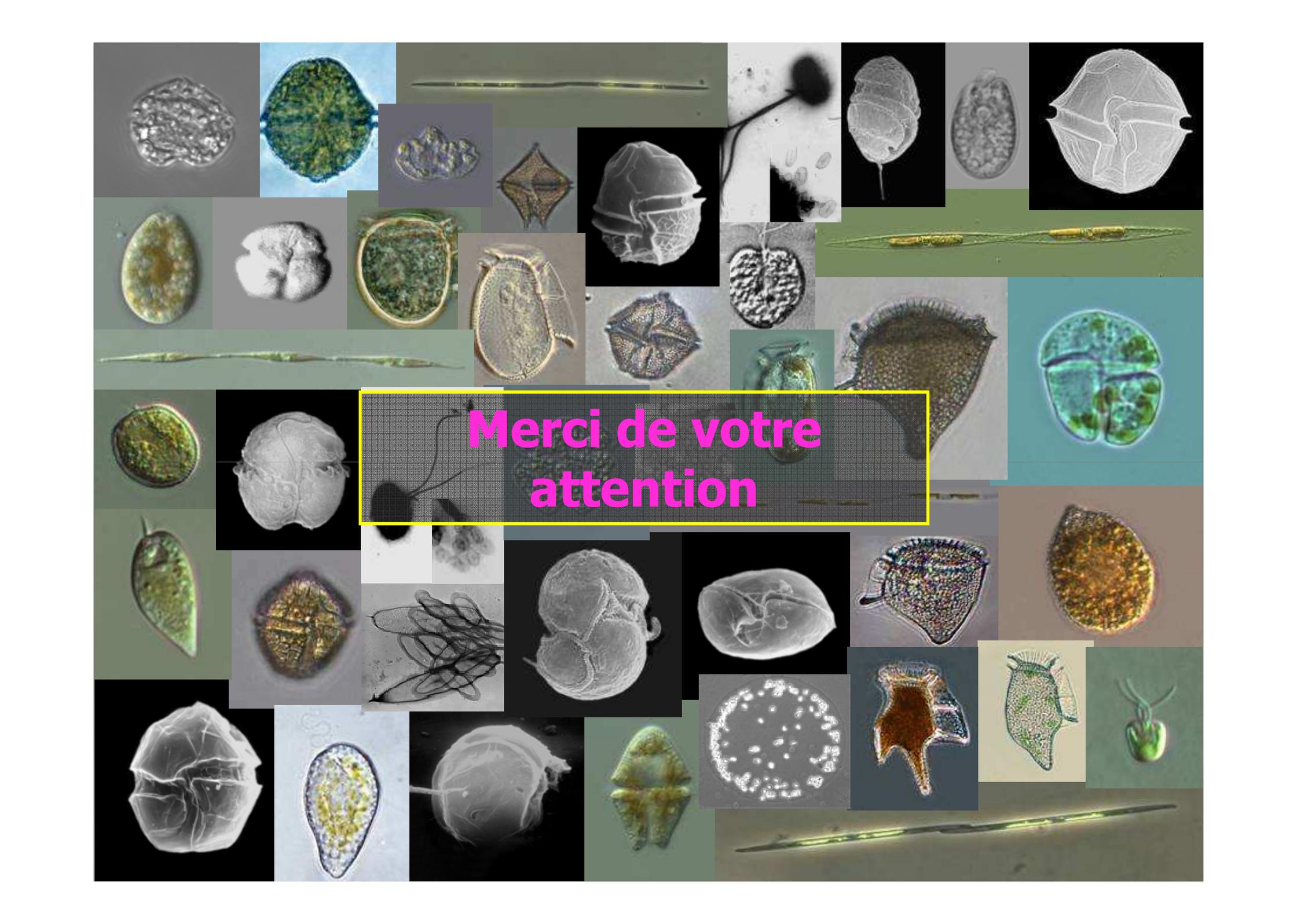
**Pour la recherche** : jusqu'à quel niveau taxinomique (espèce ou clade) le signal de biodiversité génétique (phylogénie) correspond-t-il à un signal écologique (phénologie) ?

**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**

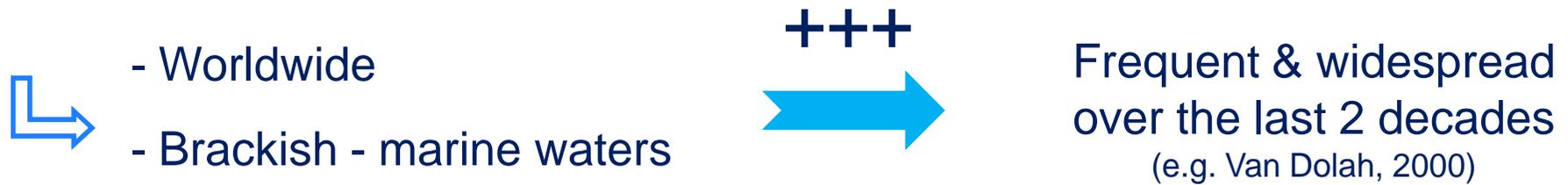
M. Schapira & R. Le Gendre  
S. Françoise, P. Riou

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)



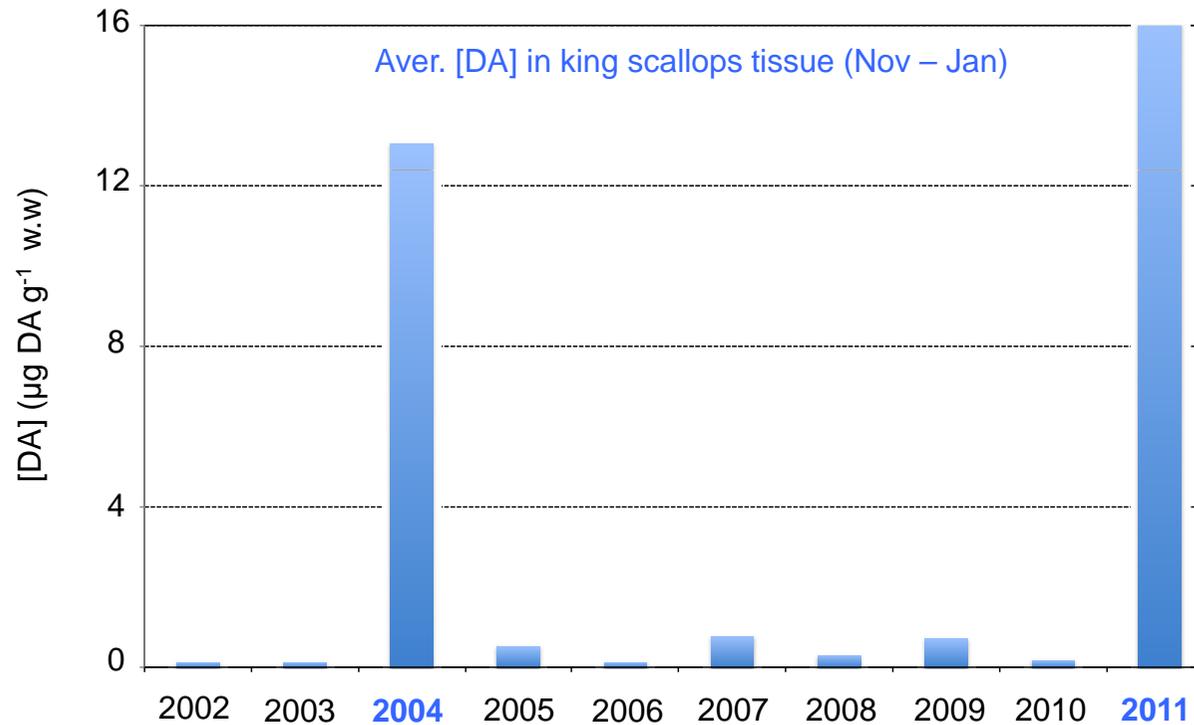
- ❖ Megatidal regime
- ❖ Large freshwater inputs
  - Seine river ( $418 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ )
  - Many secondary watersheds

# BAY OF SEINE (Eastern English Channel)



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

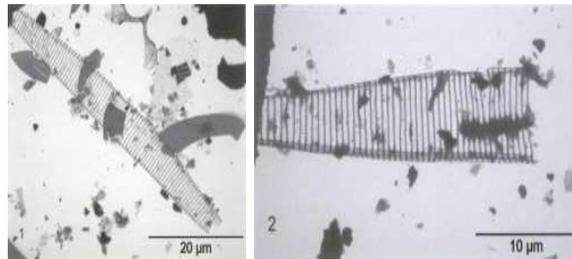
[DA] > EU-regulatory limit (i.e. 20 µg DA g<sup>-1</sup> w.w.)

↳ Proscription of harvesting

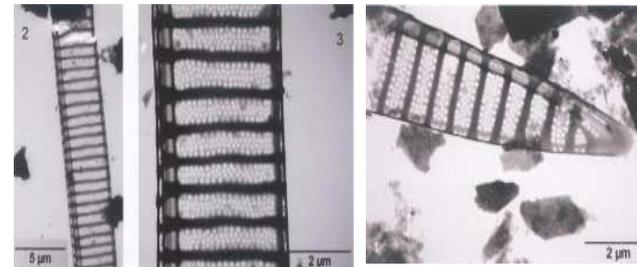
➔ DIATOM: *Pseudo-nitzschia* spp.



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

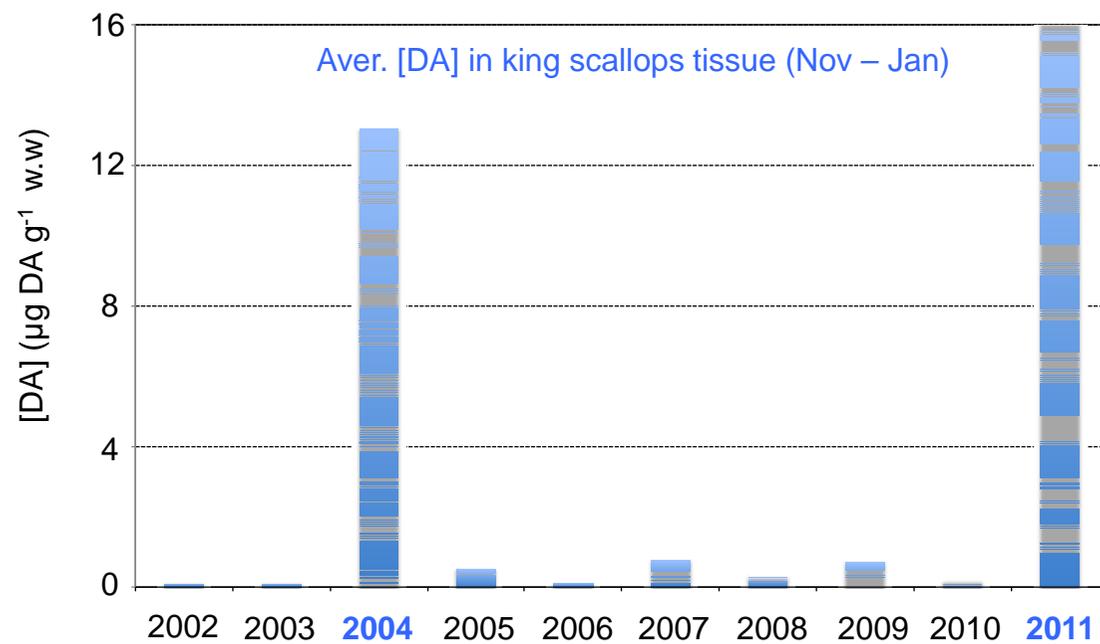


*Pseudo-nitzschia australis*



*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.*

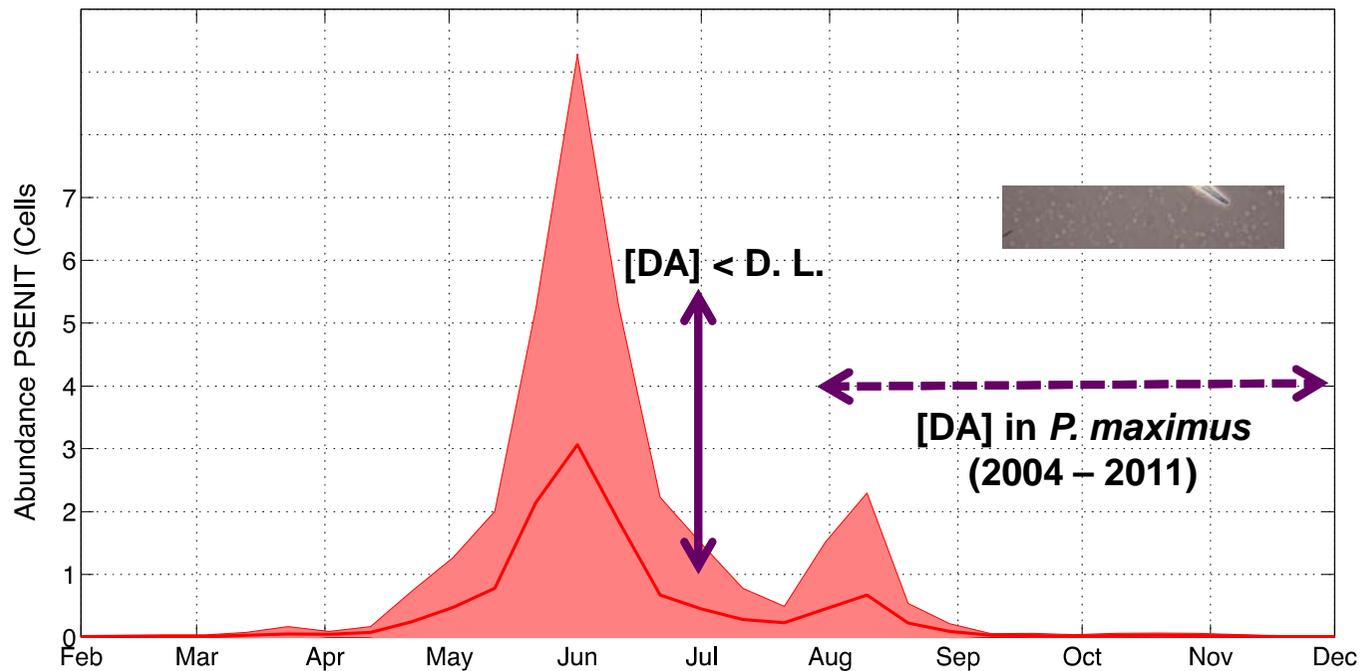
*Vs*

*Toxicity ?*

# PHYTOPLANKTON

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

**2 blooms of *Pseudo-nitzschia* spp.**

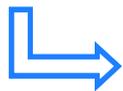
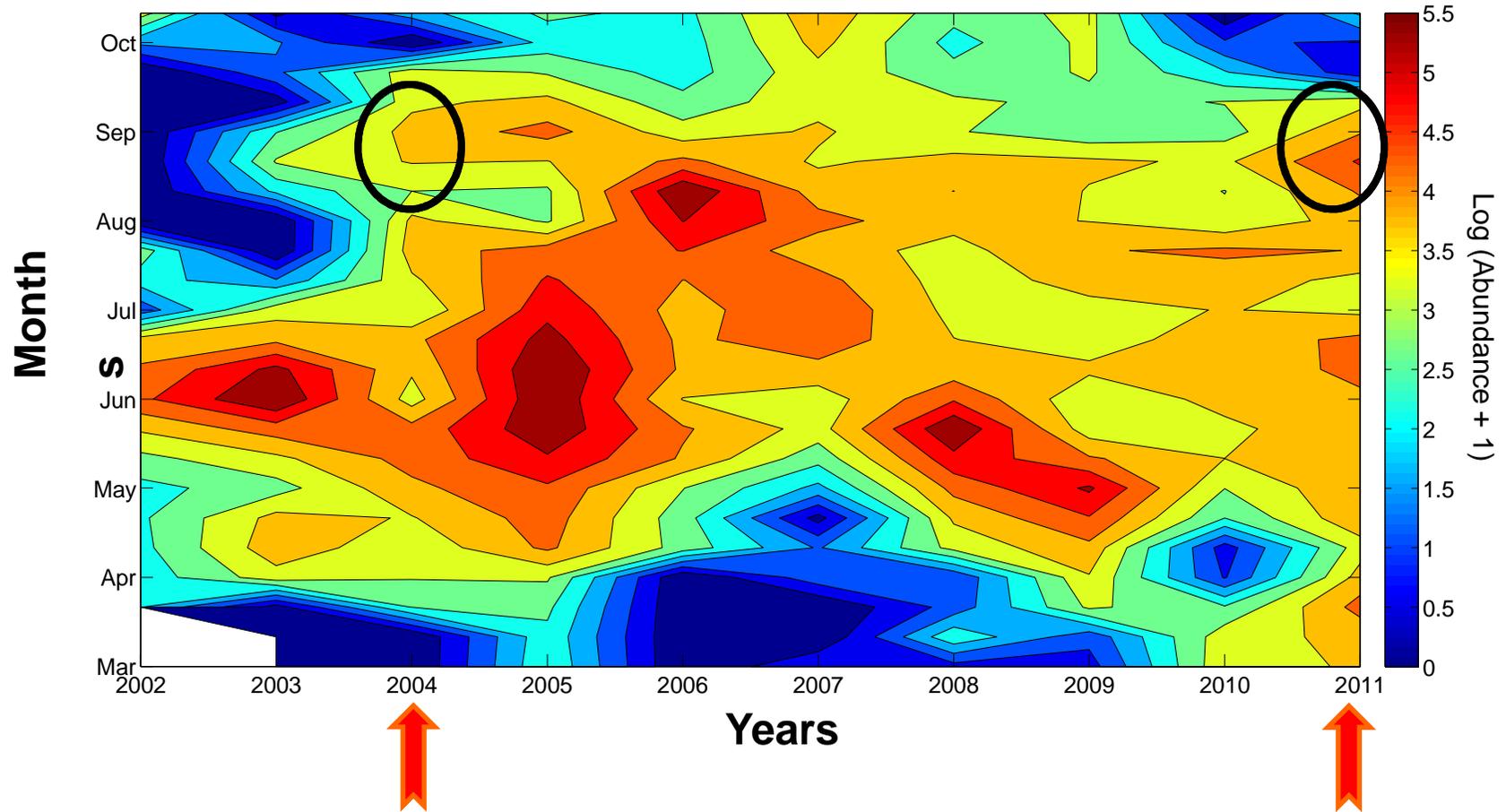


↳ **Summer bloom = toxic ?**

# PSEUDO-NITZSCHIA



*Pseudo-nitzschia* spp.

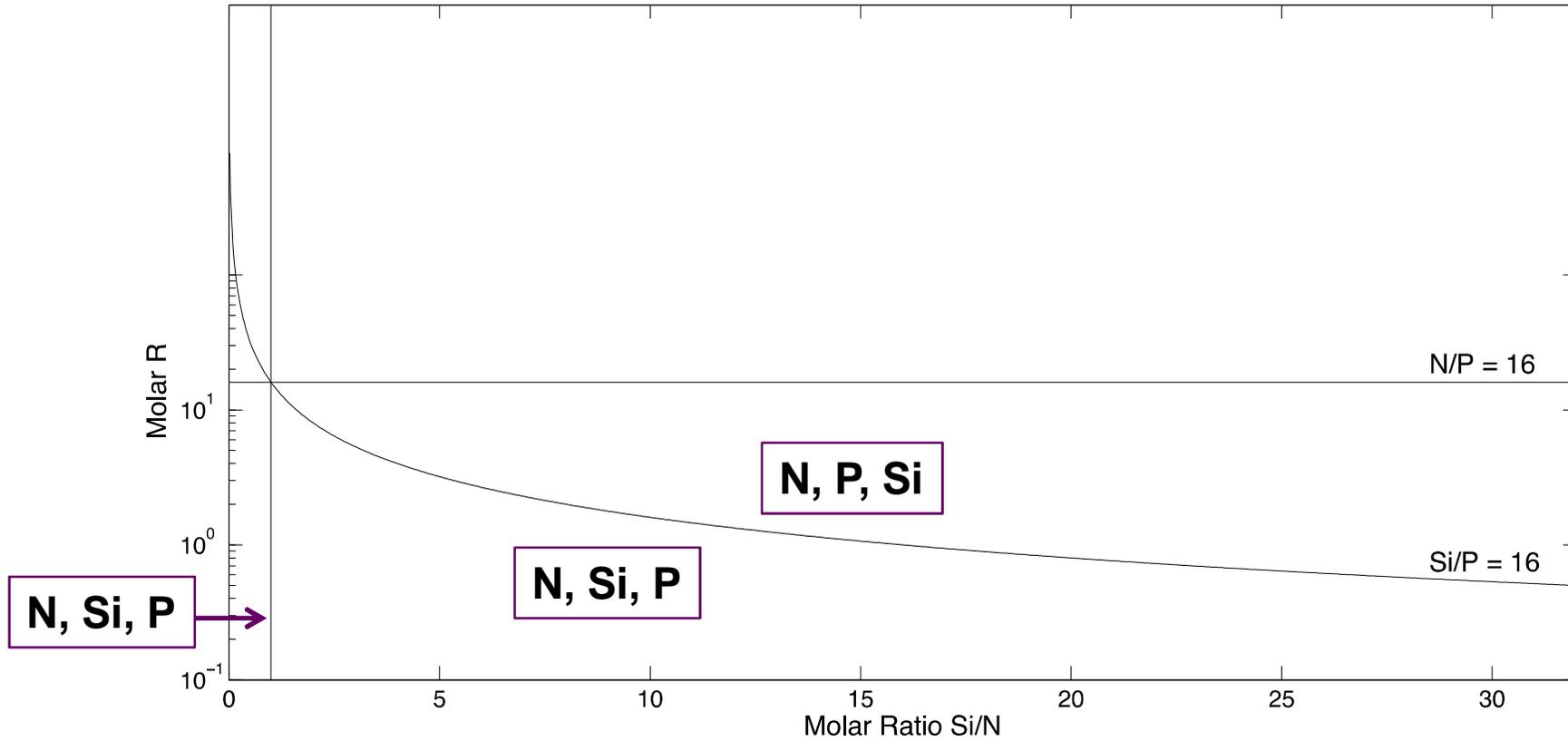


No significant relationship ( $p > 0.05$ )  
between *Pseudo-nitzschia* spp abundances and [DA]

*Role of hydrological parameters  
on domoic acid production ?*

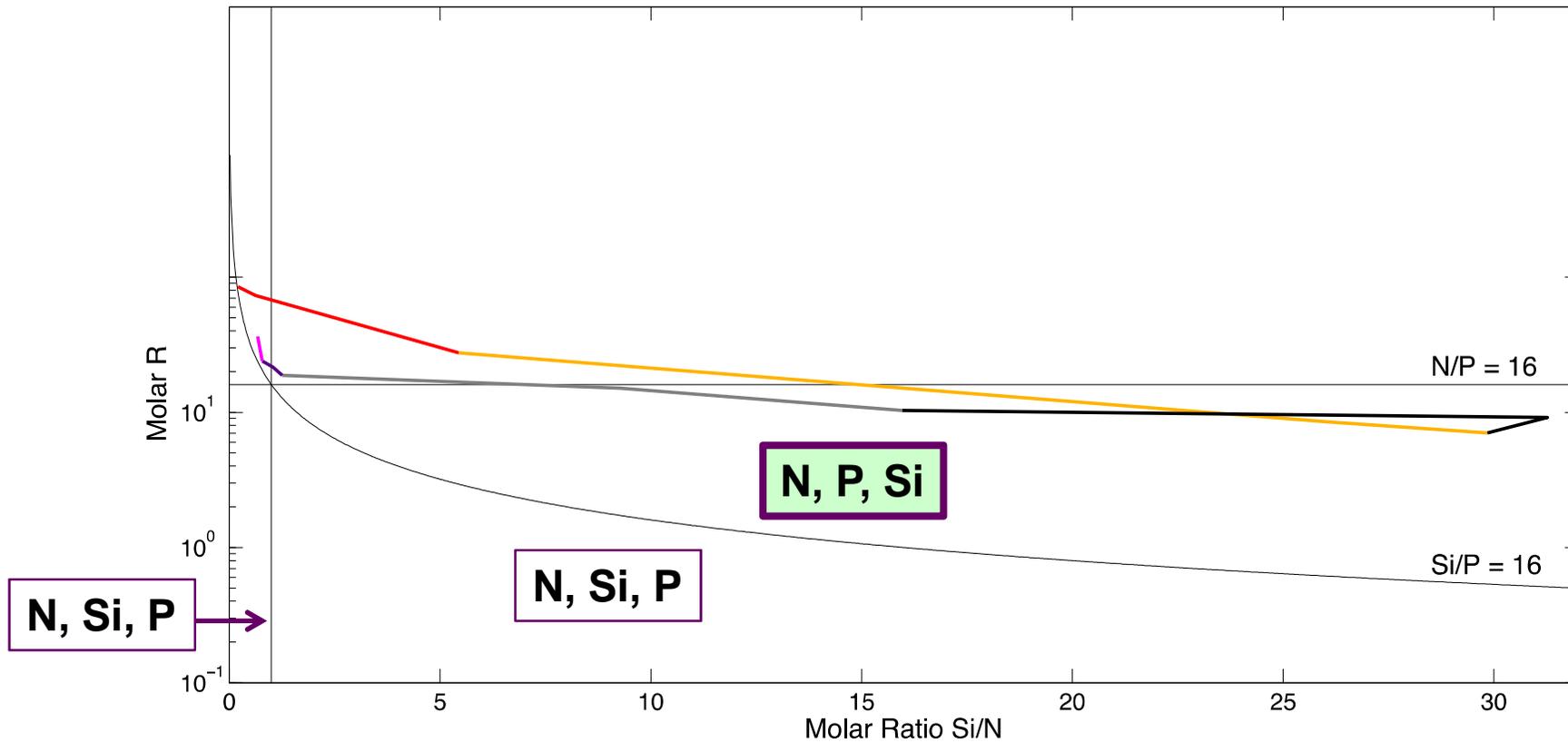
# NUTRIENTS

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



# NUTRIENTS

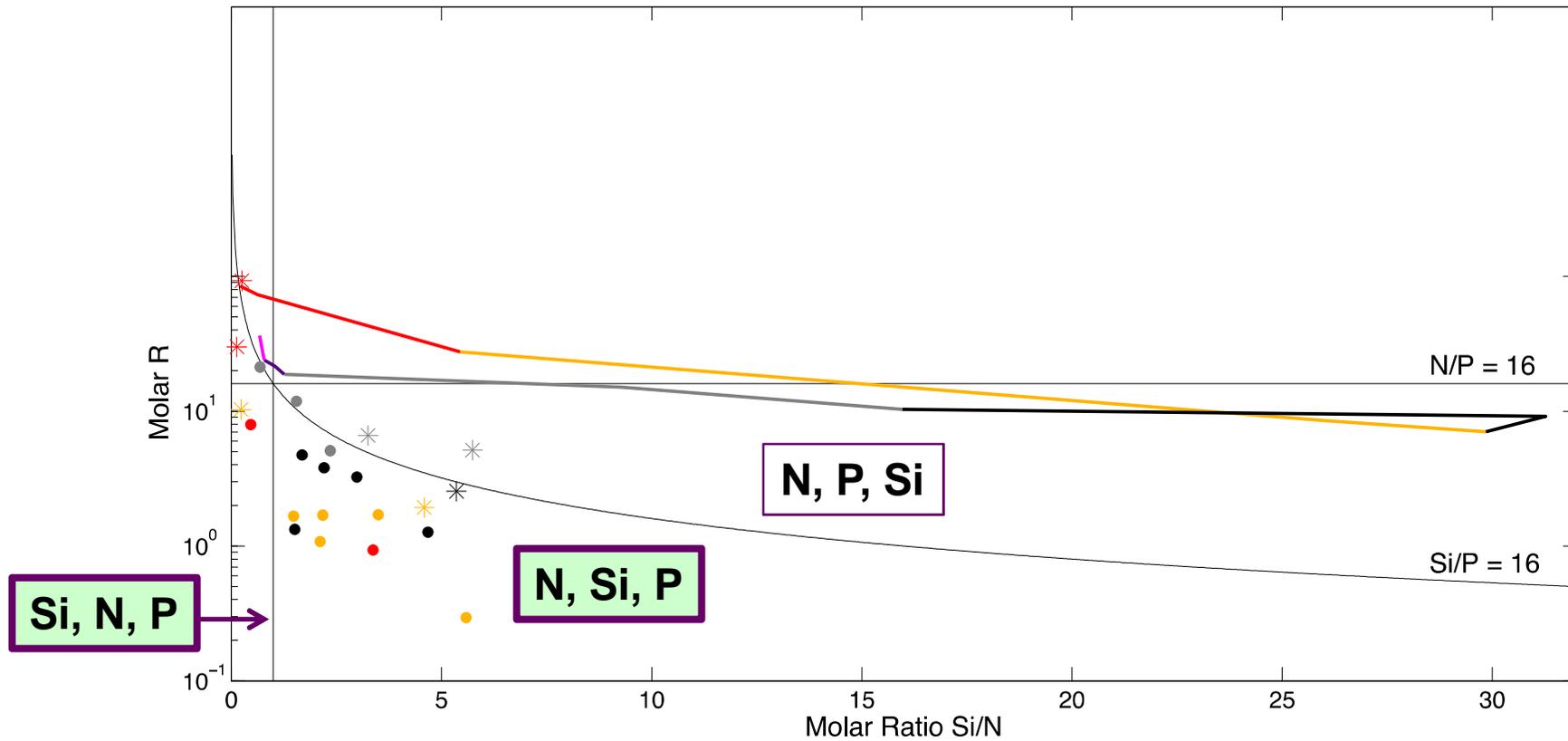
Redfield ratios: Si/N/P = 16/16/1



↳ Summer : N & P = potential limiting factors

# NUTRIENTS

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



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

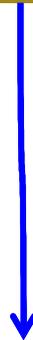
**NUTRIENTS**



**Si limitation**



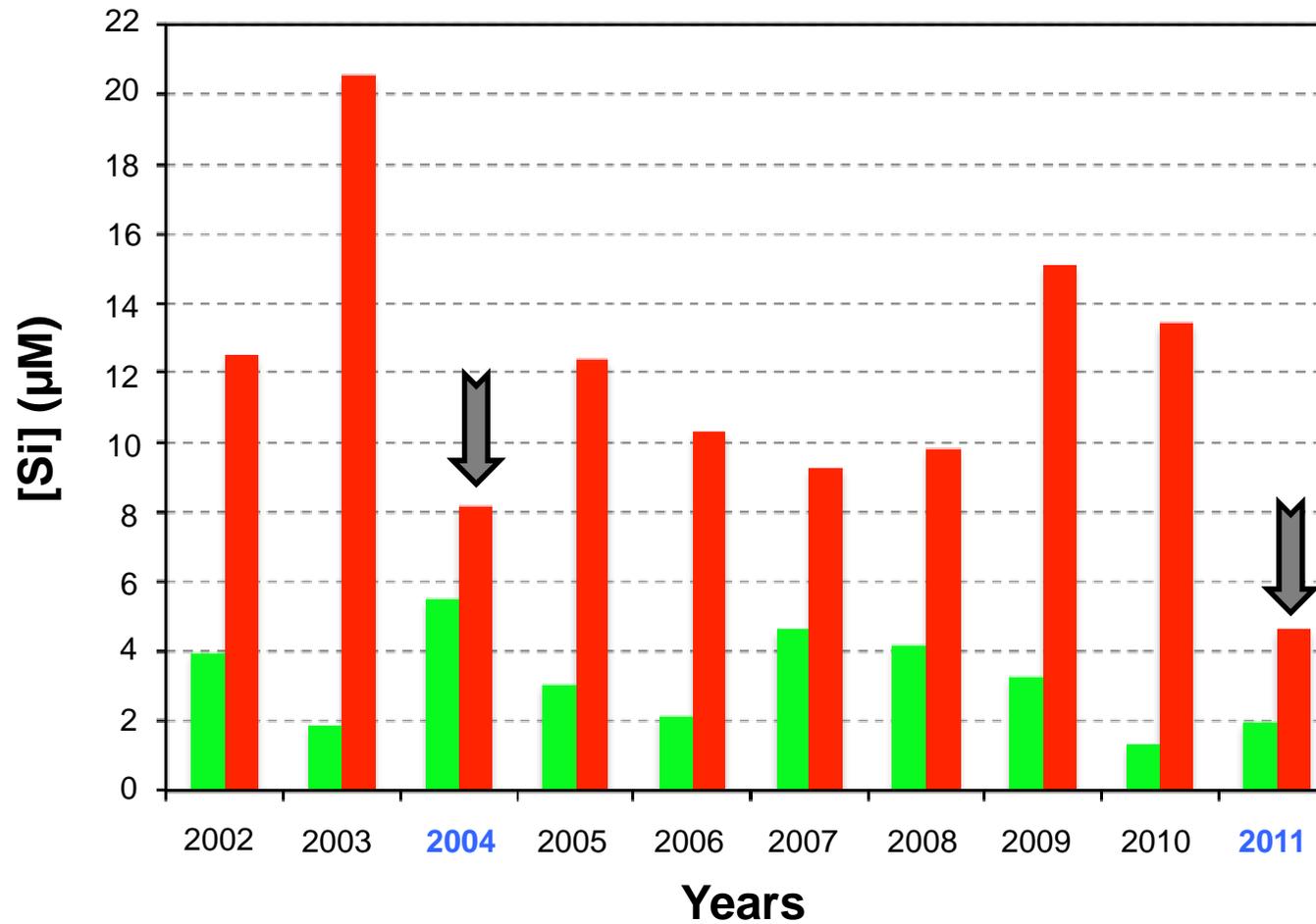
**Metabolic processes**



**DOMOIC ACID PRODUCTION**

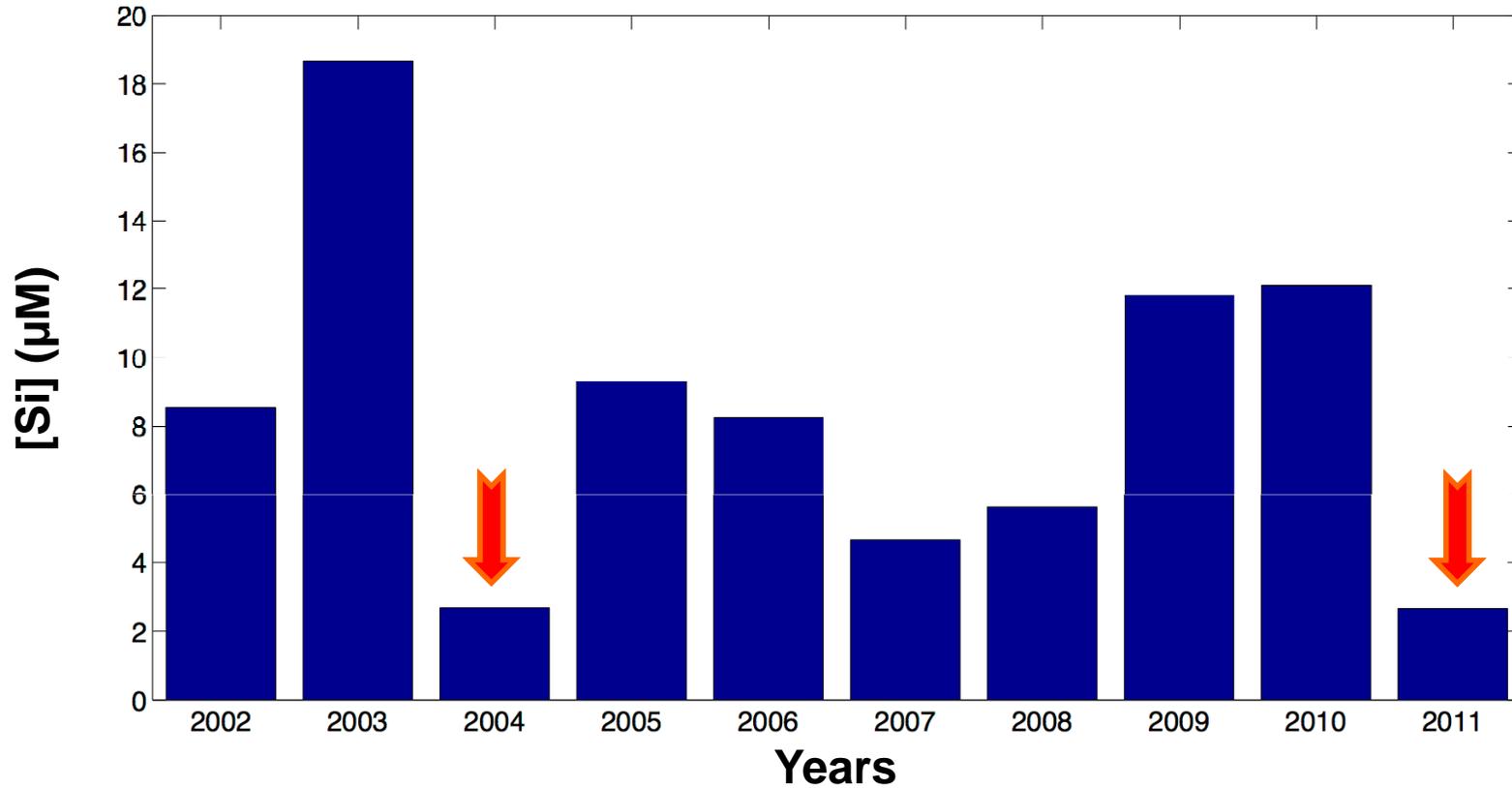
# [Si]

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



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

## Summer – Spring [Si]



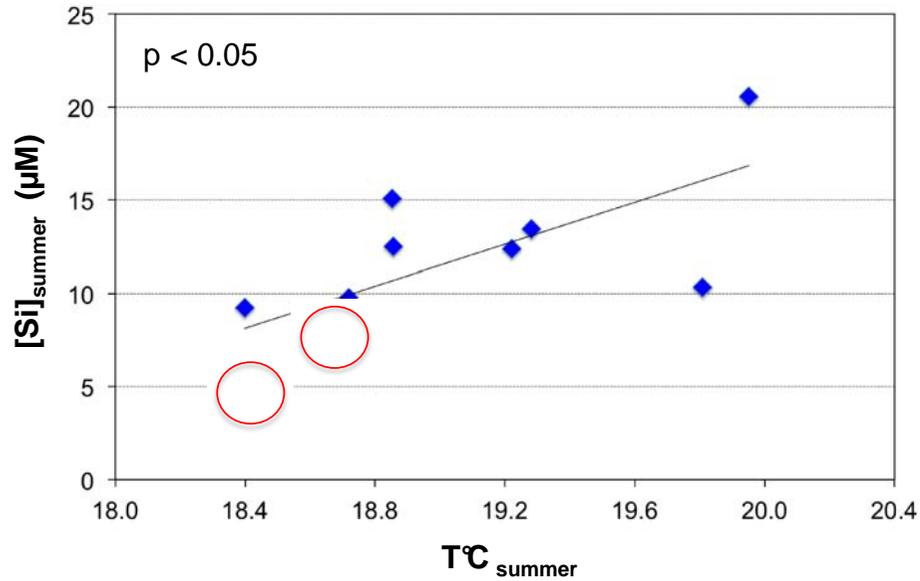
↳ 2004 & 2011: weak increase in [Si] from spring to summer

➔ 2004 & 2011: Weak Si regeneration ?

*Factors controlling Si regeneration ?*

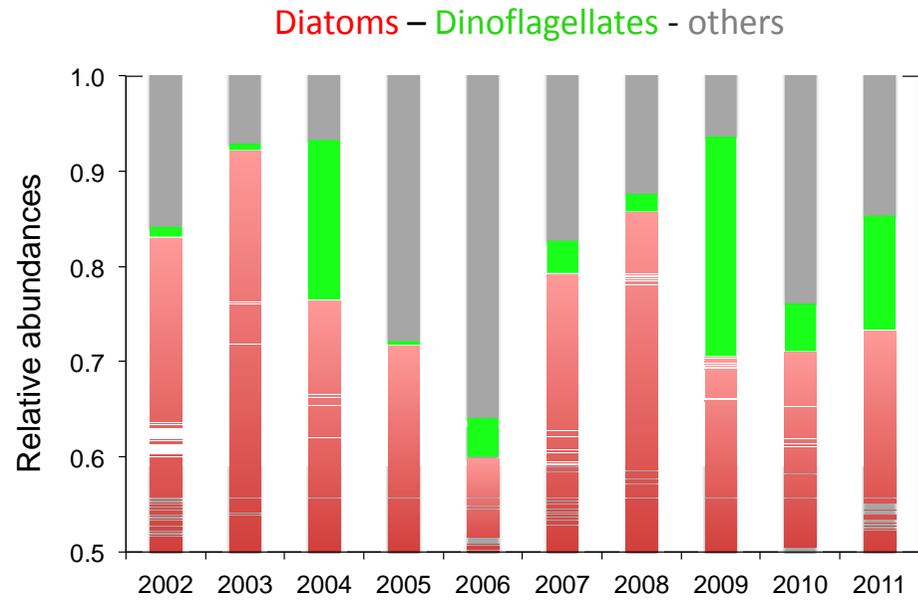
# Si REGENERATION

## ❖ Temperature ?



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

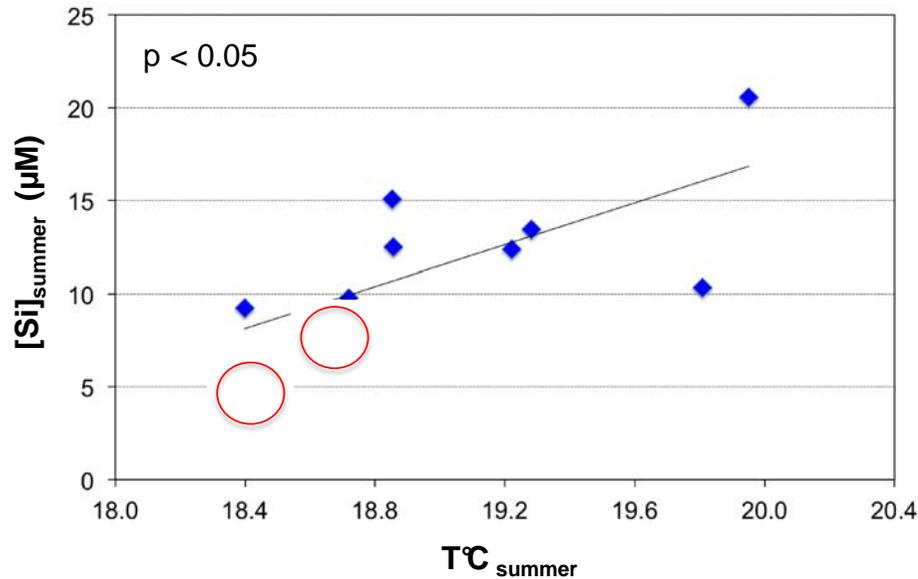
## ❖ B-Si in spring ?



↳ 2004 & 2011: Dinoflagellates abundant in spring

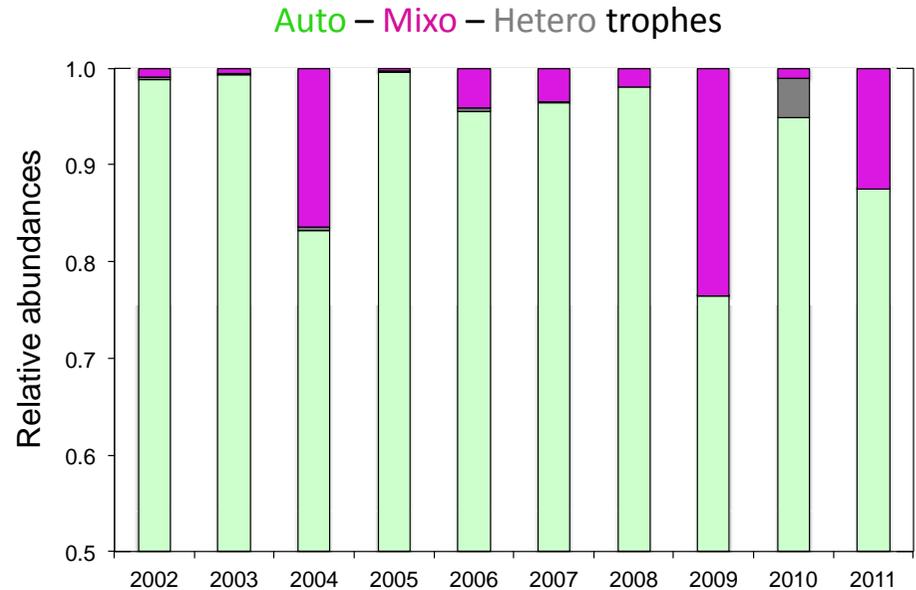
# Si REGENERATION

## ❖ 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

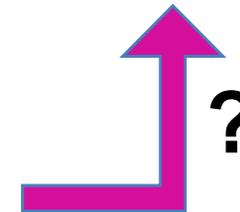


## Si regeneration processes

- 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

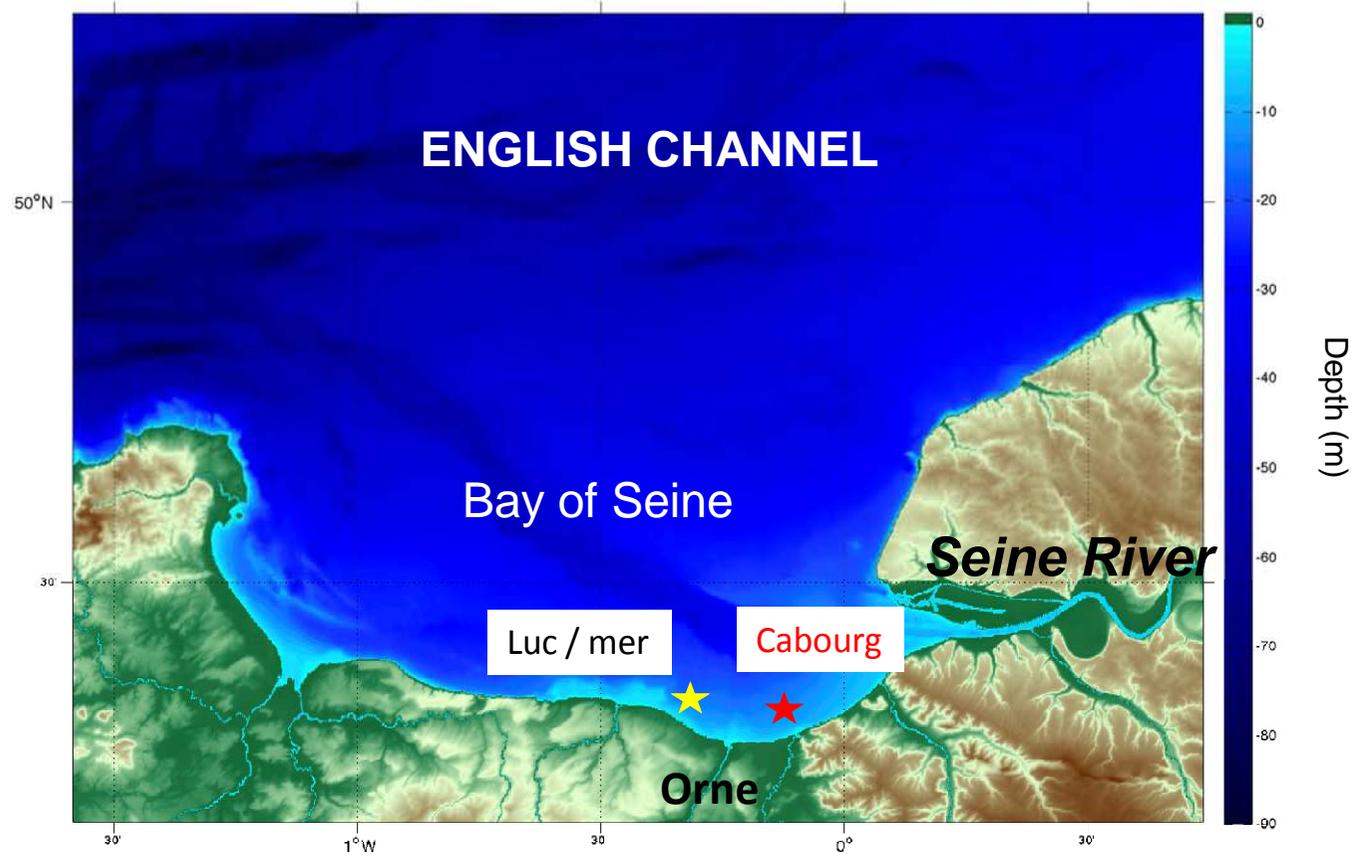
## 3) Rôle des panaches de la Seine et de l'Orne

## 4) Identifier les facteurs contrôlant

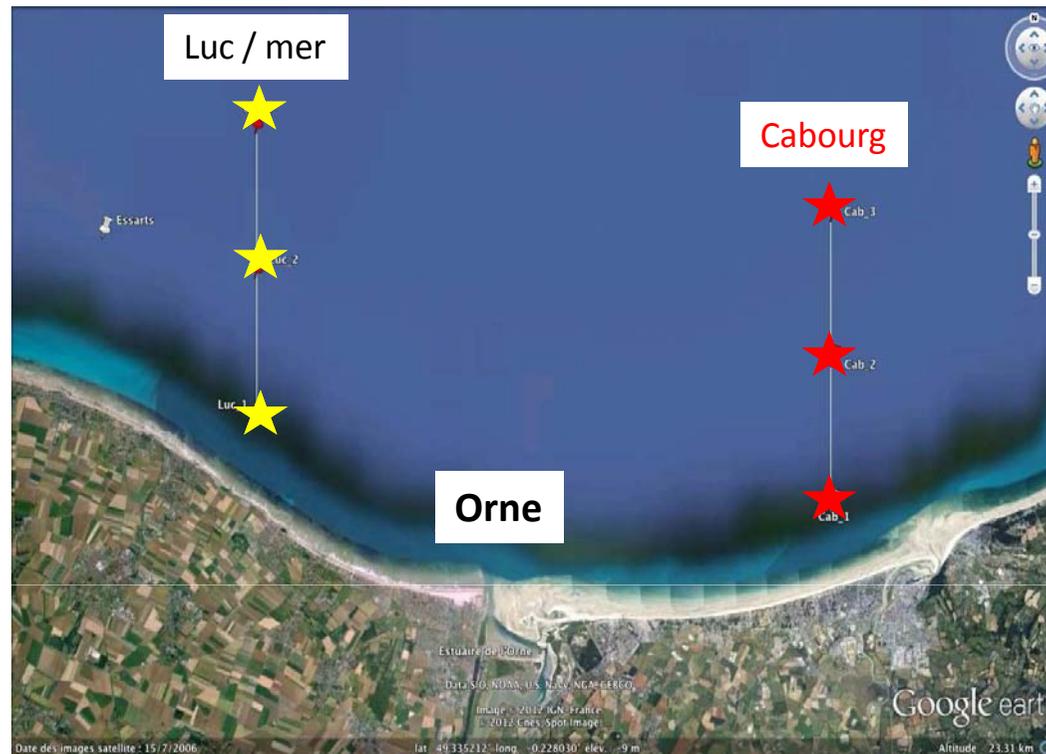


- Identification des différentes espèces de PZN
- Suivi de la concentration [DA]
- Suivi des paramètres physico-chimiques et biologiques

# 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, [O<sub>2</sub>], 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)***

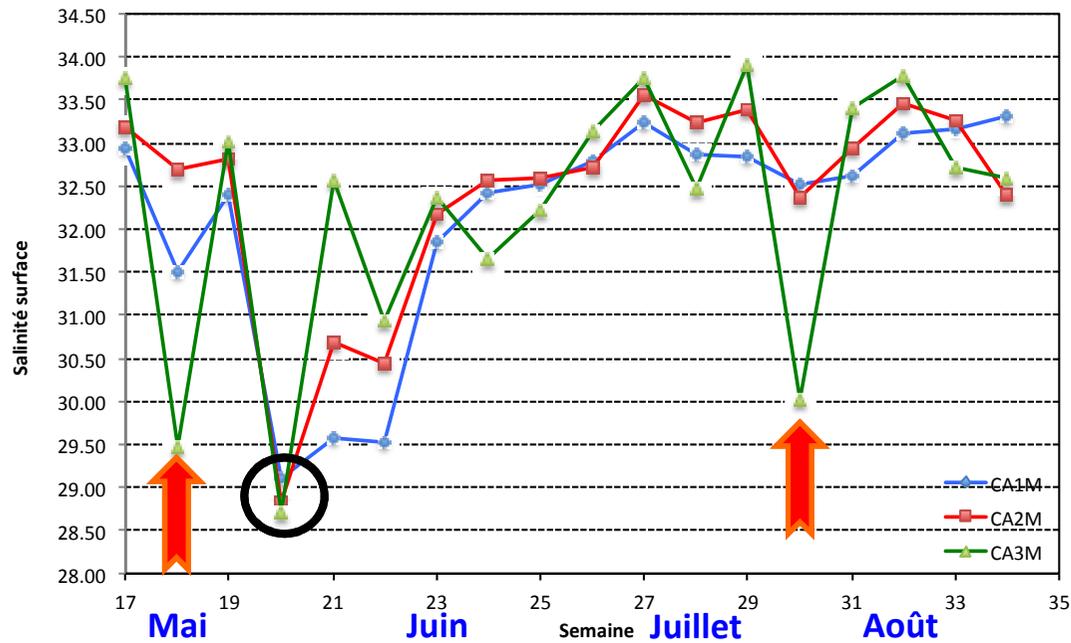
# PREMIERS RESULTATS

## Luc sur Mer

Salinité (surface)



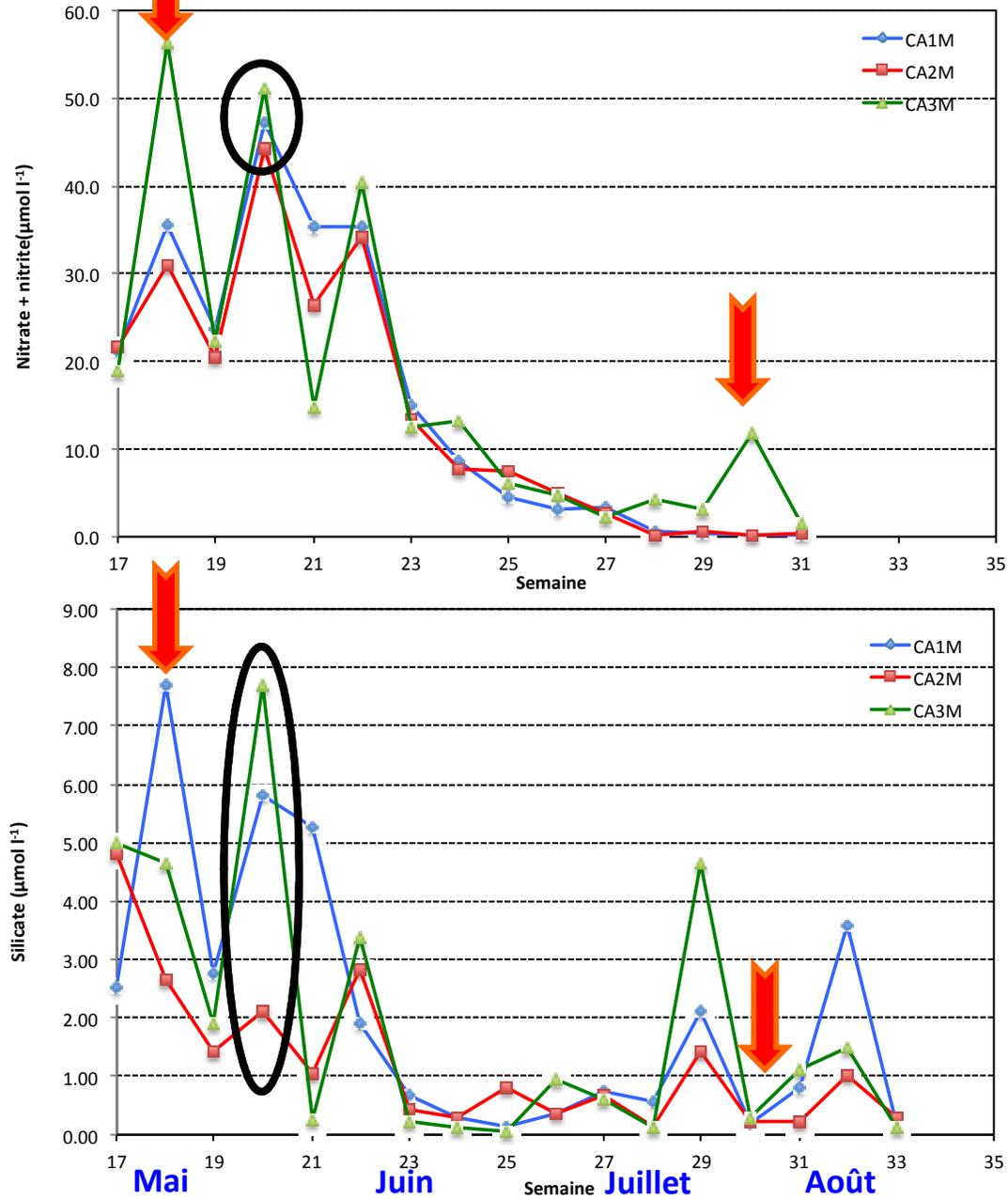
## Cabourg



# PREMIERS RESULTATS

Sels nutritifs (surface)

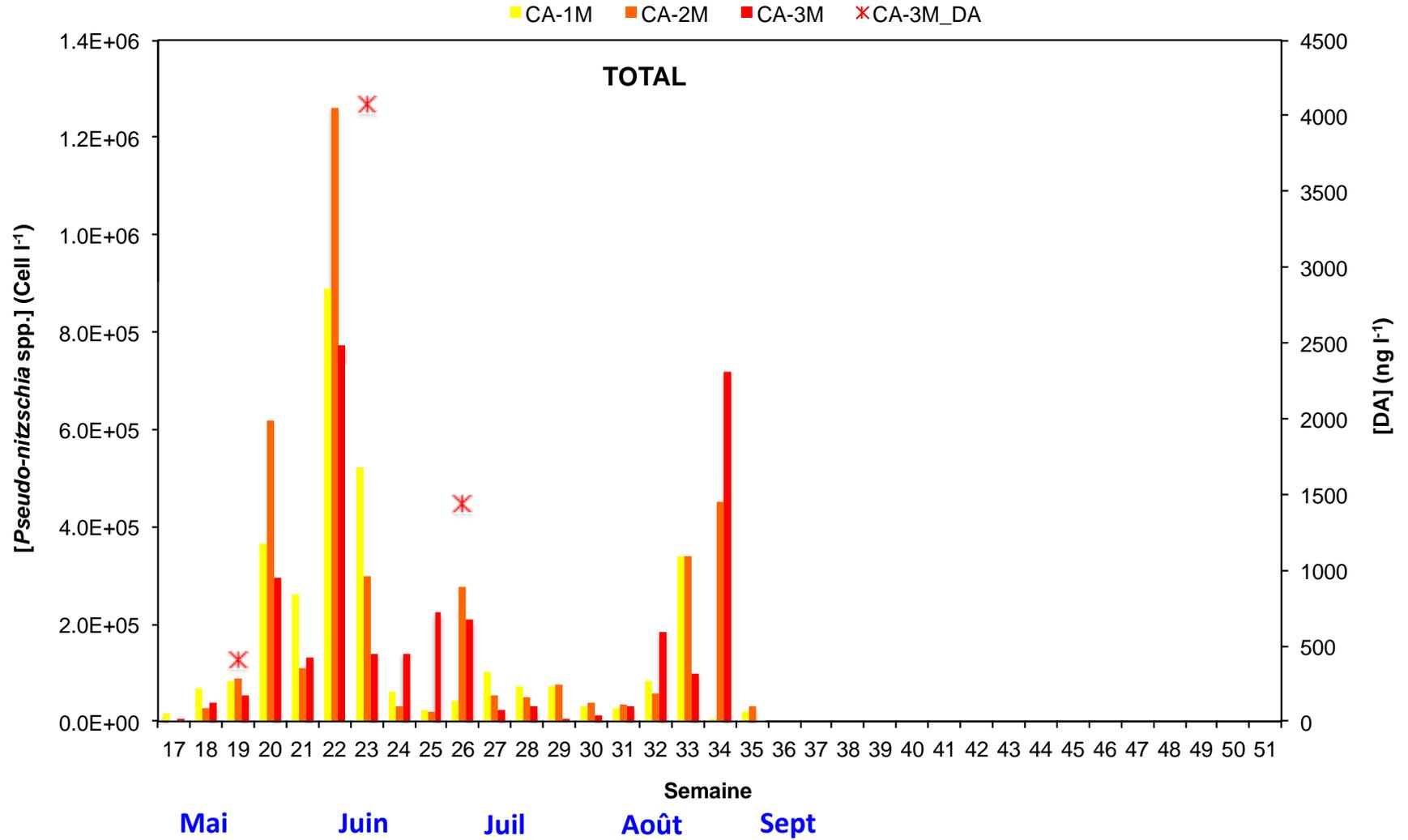
## Cabourg



# PREMIERS RESULTATS

Abondances  
*Pseudo-nitzschia* - [DA] ng l<sup>-1</sup>

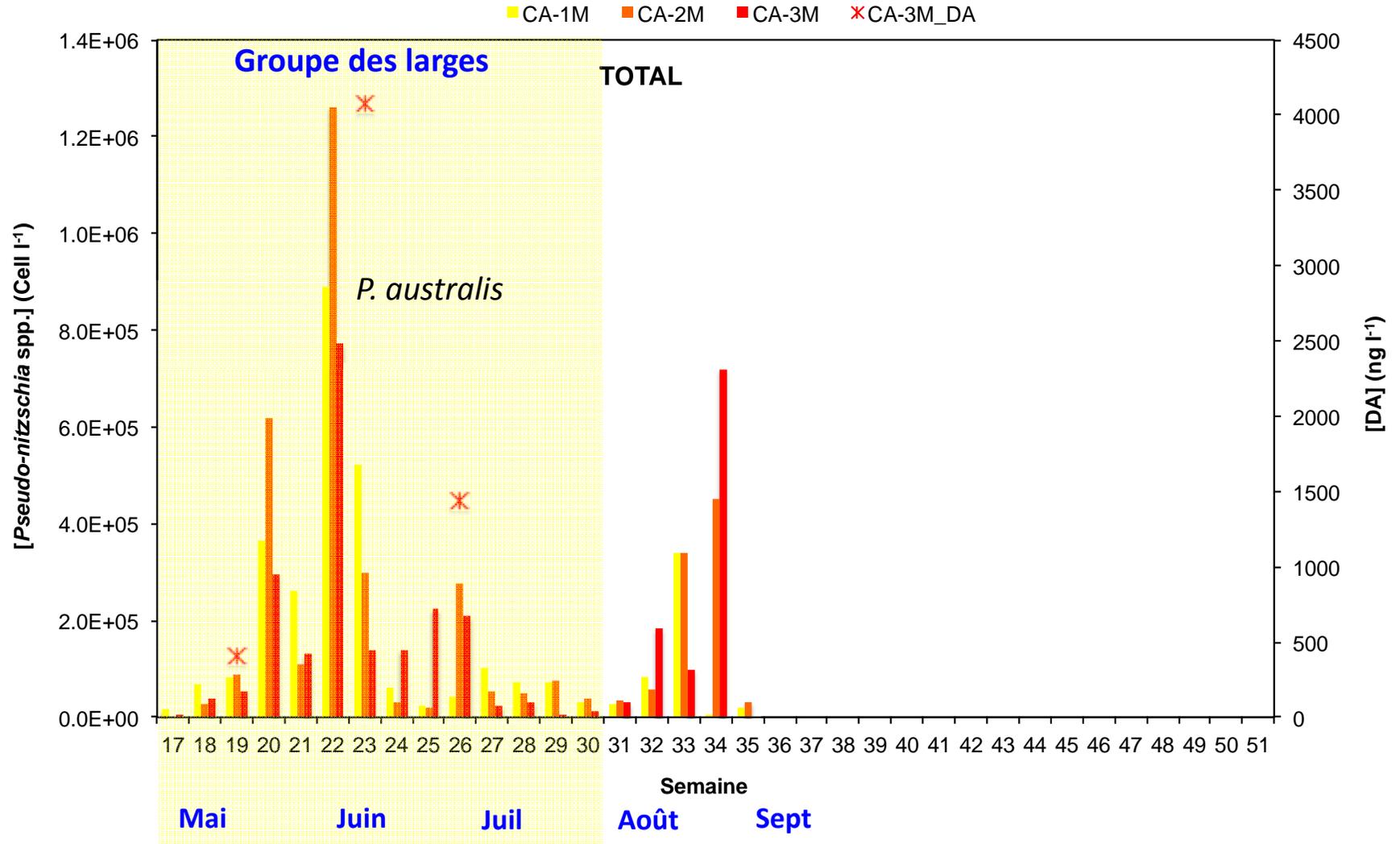
## CABOURG



# PREMIERS RESULTATS

Abondances  
*Pseudo-nitzschia* - [DA] ng l<sup>-1</sup>

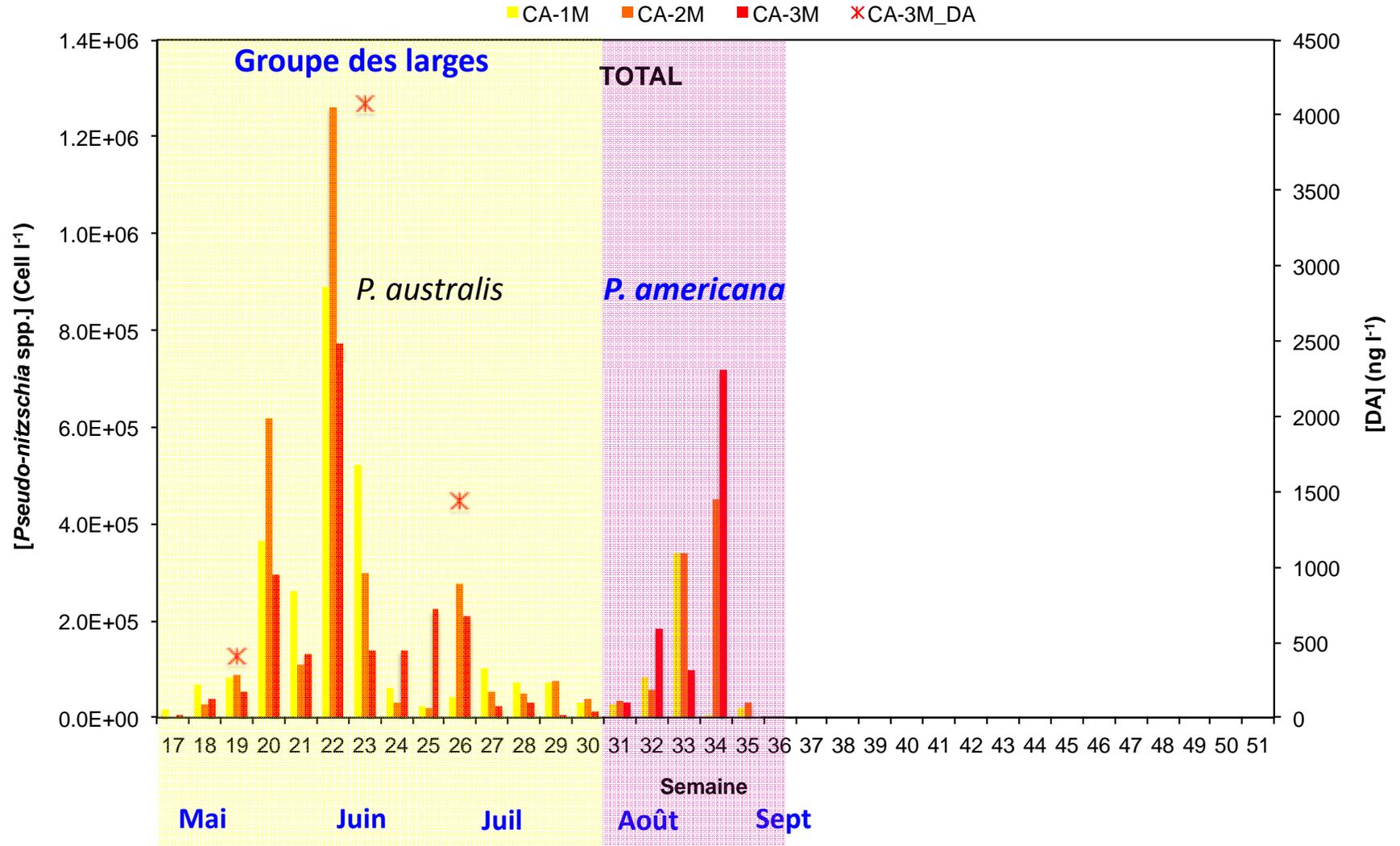
## CABOURG



# PREMIERS RESULTATS

Abondances  
*Pseudo-nitzschia* - [DA] ng l<sup>-1</sup>

## CABOURG



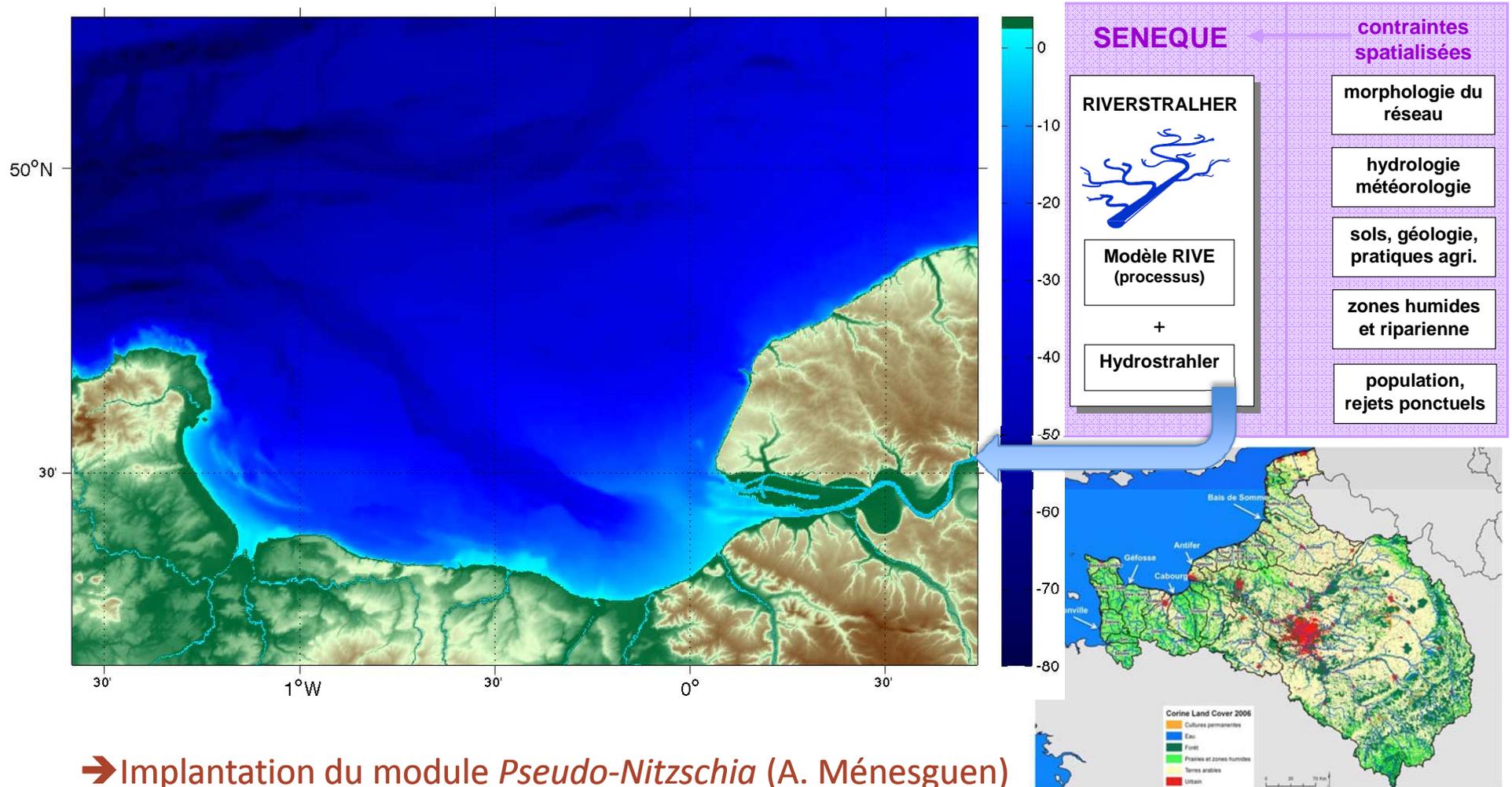
# Projet Liteau Décembre 2012

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)

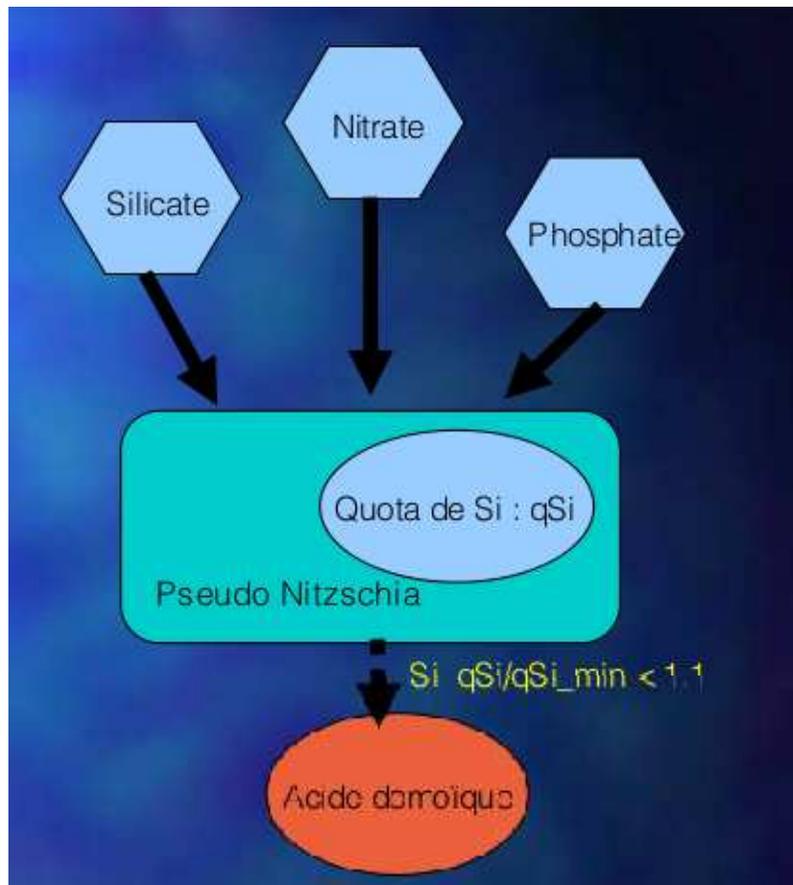


# Utilisation du modèle bio Baie de Seine (500m) couplé avec Riverstrahler (Paris 6)



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

**AXE 2 : Chaîne de modélisation des continuums aquatiques**

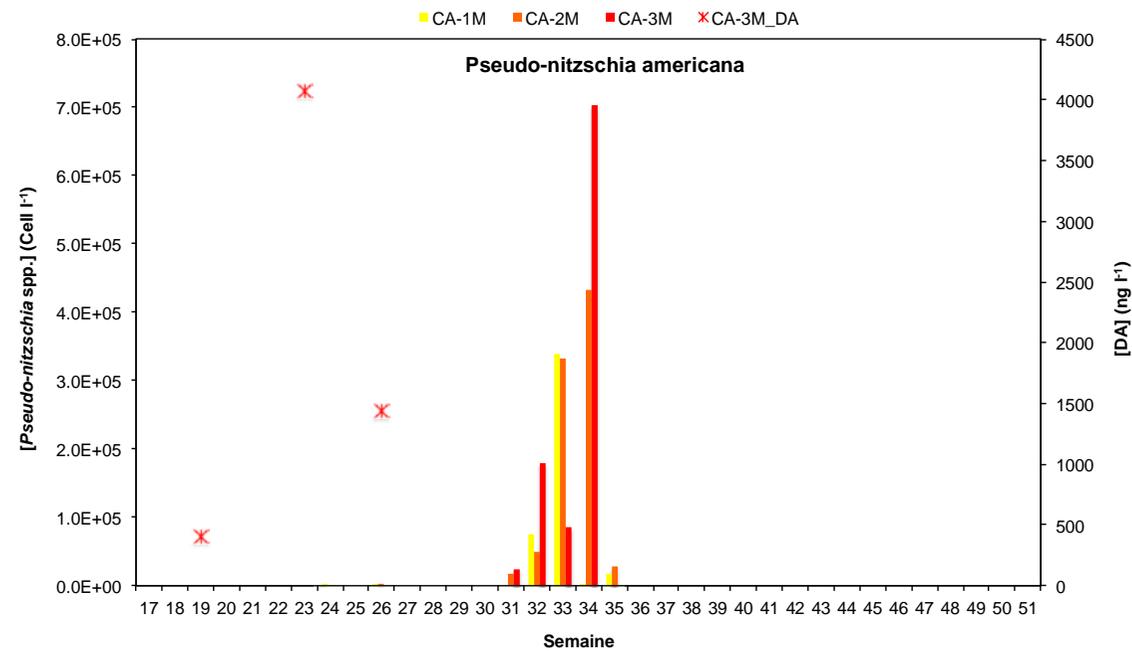
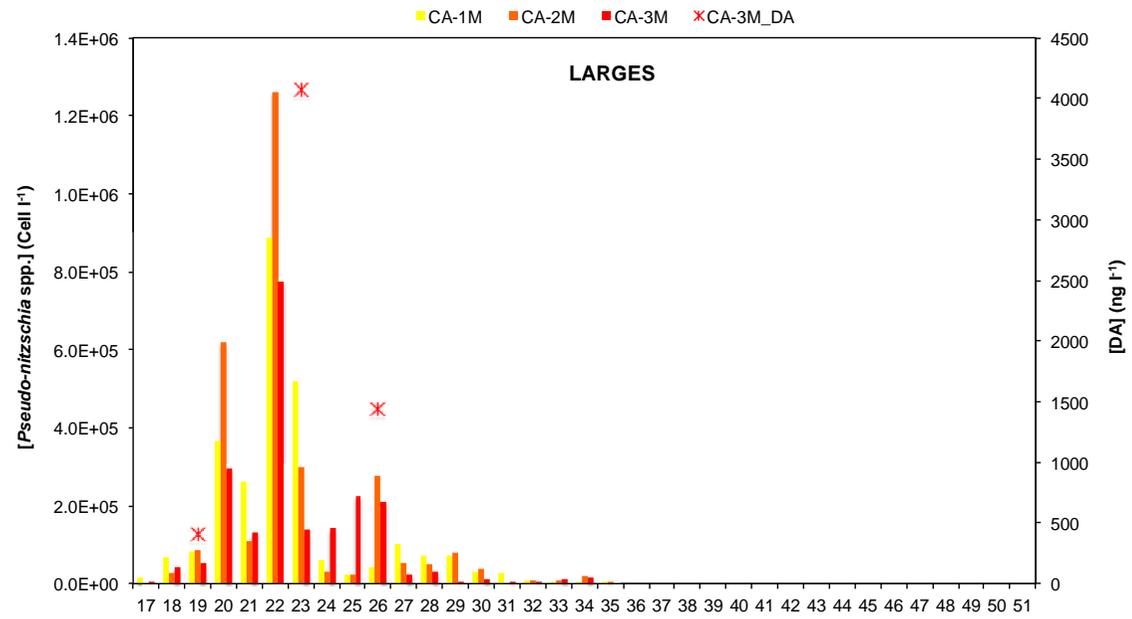


- Module *Pseudo-Nitzschia* : adapté du modèle de Davidson et Fehling (2006, African JoMS)
- Hypothèse utilisée par ce module : la toxicité apparaît quand le quota interne de silicium des cellules est bas

**MAIS**

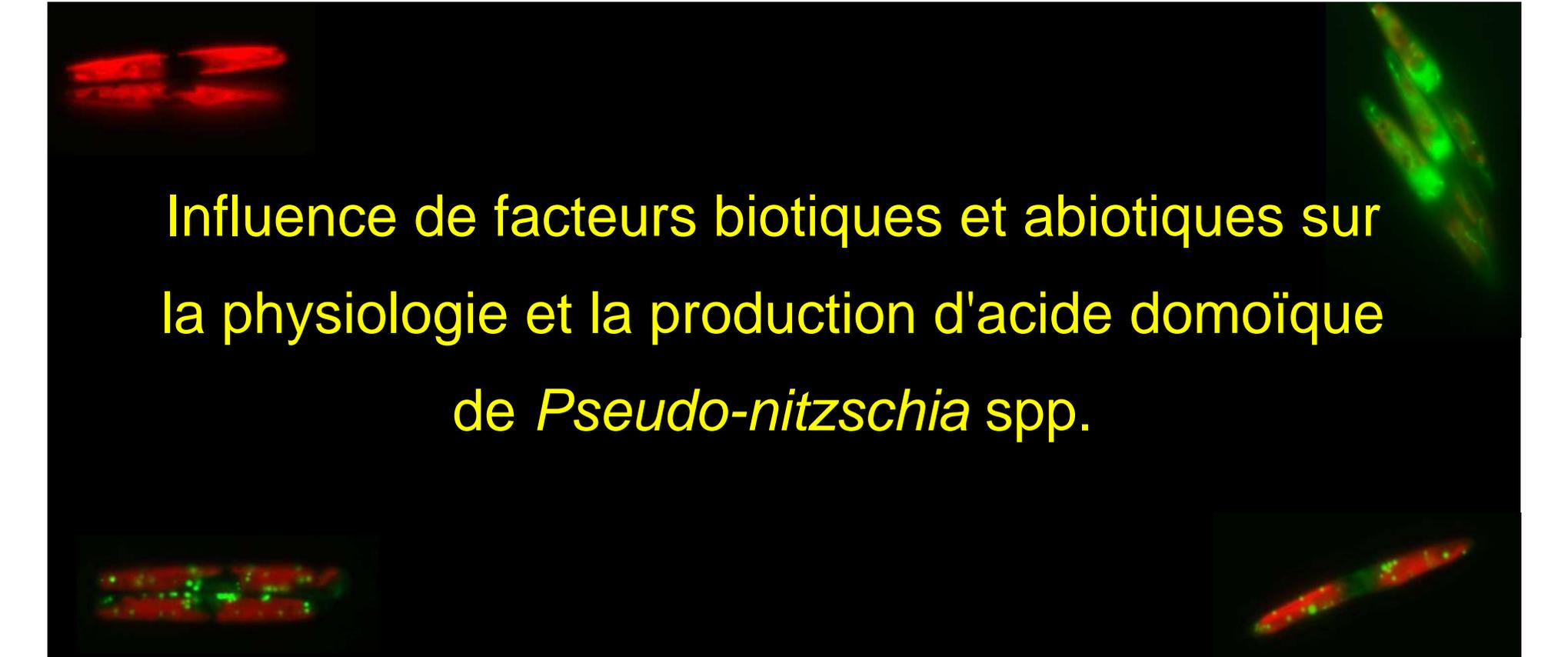
- module générique (une seule variable représentant tout le genre PN)
- production d'acide domoïque uniquement liée à une limitation en Si
- pas de jeu de données adaptées à la validation de ce module (acide domoïque/reconnaissance d'espèces/suivi temporel) → **TAPAS**

*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

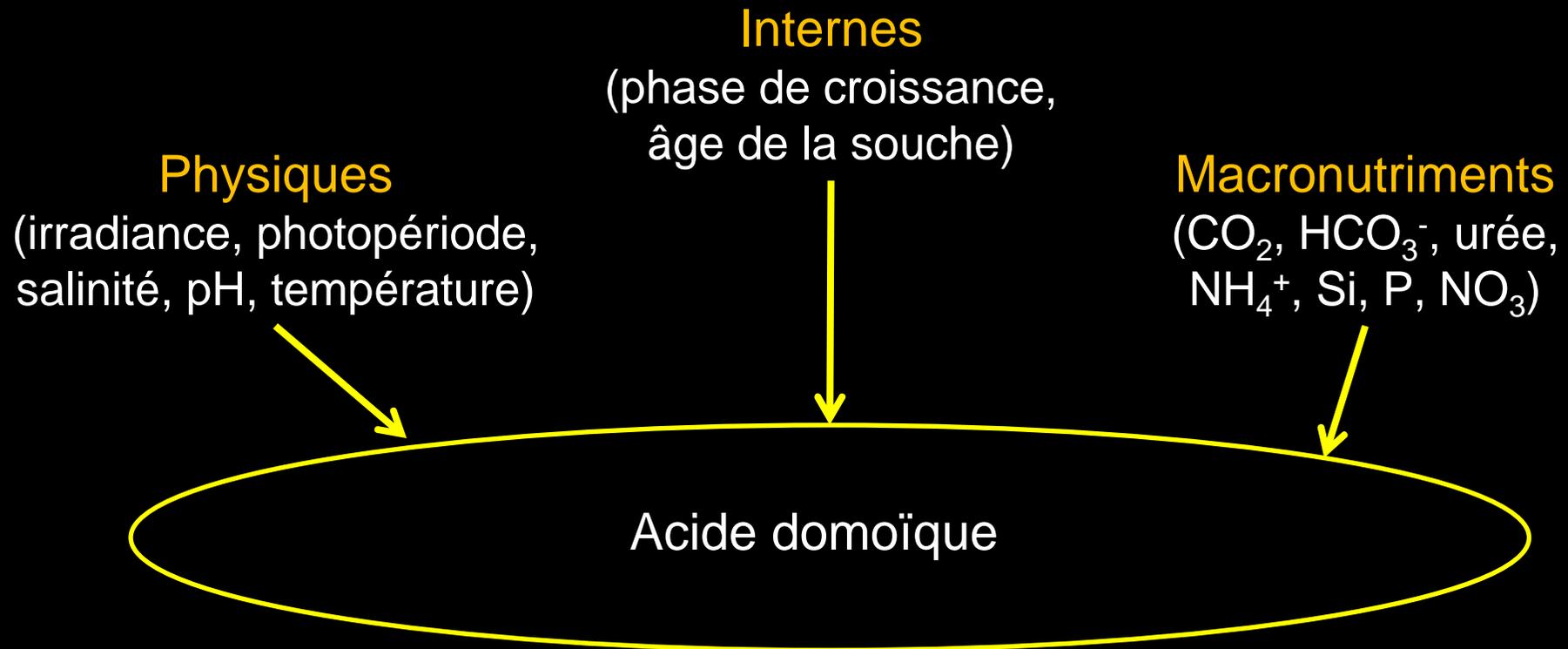


Influence de facteurs biotiques et abiotiques sur  
la physiologie et la production d'acide domoïque  
de *Pseudo-nitzschia* spp.

Aurélie LELONG, Hélène HEGARET & Philippe SOUDANT



## Introduction générale



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

Published XXX XXX 2011

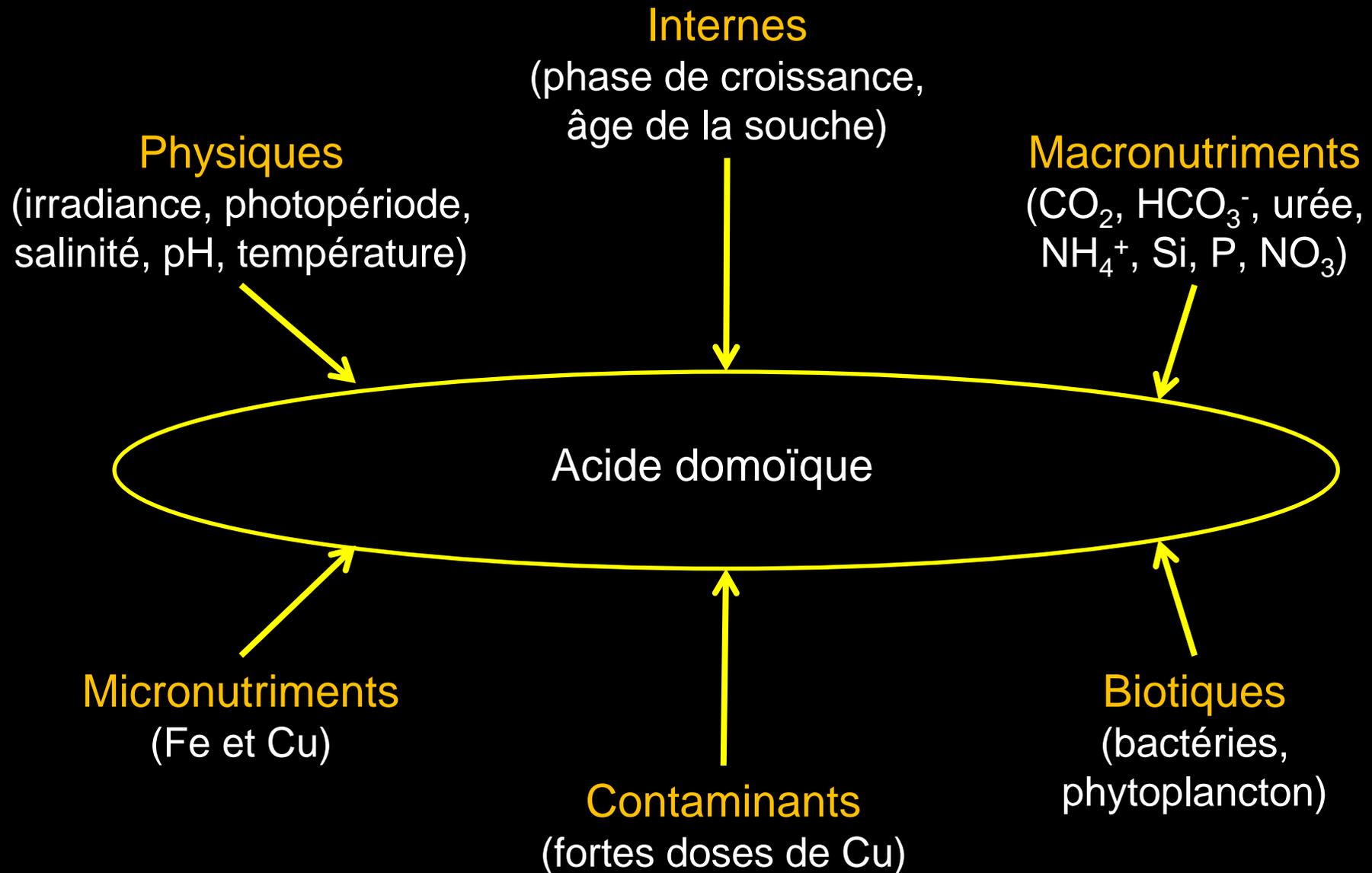
***Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) species, domoic acid and amnesic shellfish poisoning: revisiting previous paradigms**

AURÉLIE LELONG<sup>1</sup>, HÉLÈNE HÉGARET<sup>1</sup>, PHILIPPE SOUDANT<sup>1</sup> AND STEPHEN S. BATES<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>LEMAR UMR 6539, IUEM-UBO, Place Nicolas Copernic, Plouzané, France

<sup>2</sup>Fisheries 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 :**

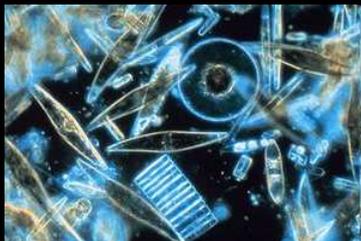
**mieux comprendre le rôle de l'AD dans la physiologie  
cellulaire et son implication dans l'écologie de cette espèce.**

### **Approches:**

**1 : caractériser l'état physiologique.**

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

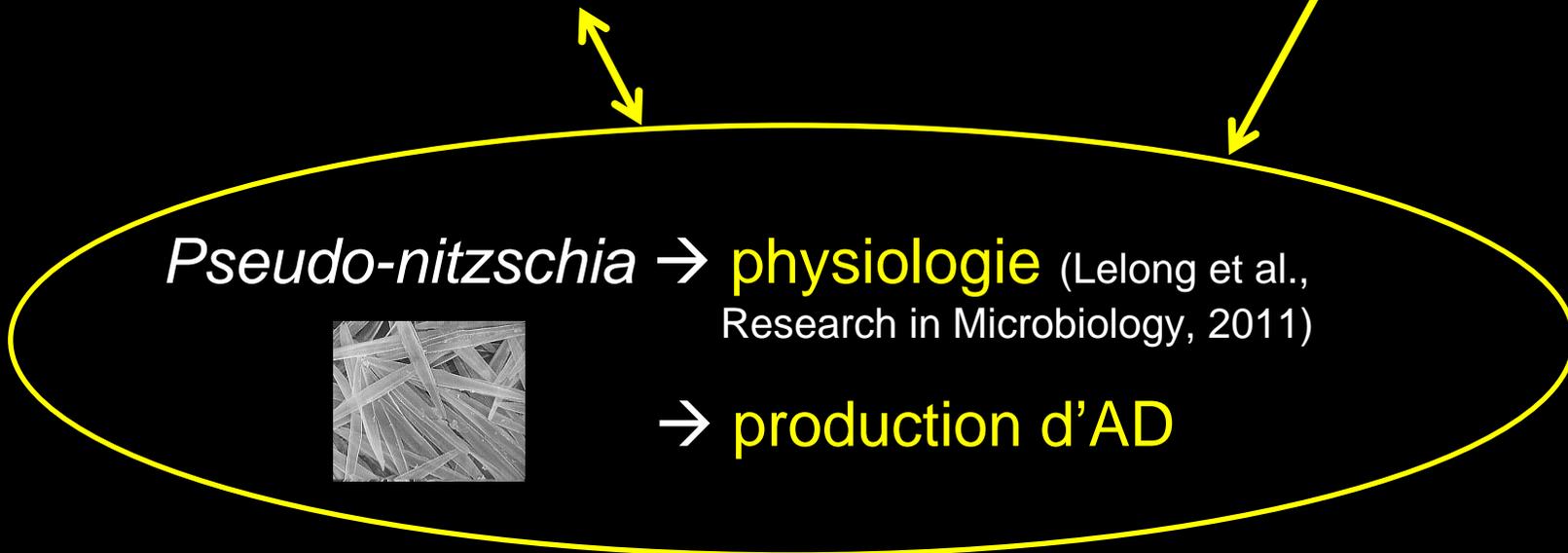
# Problématique



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

## Bactéries

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



## 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

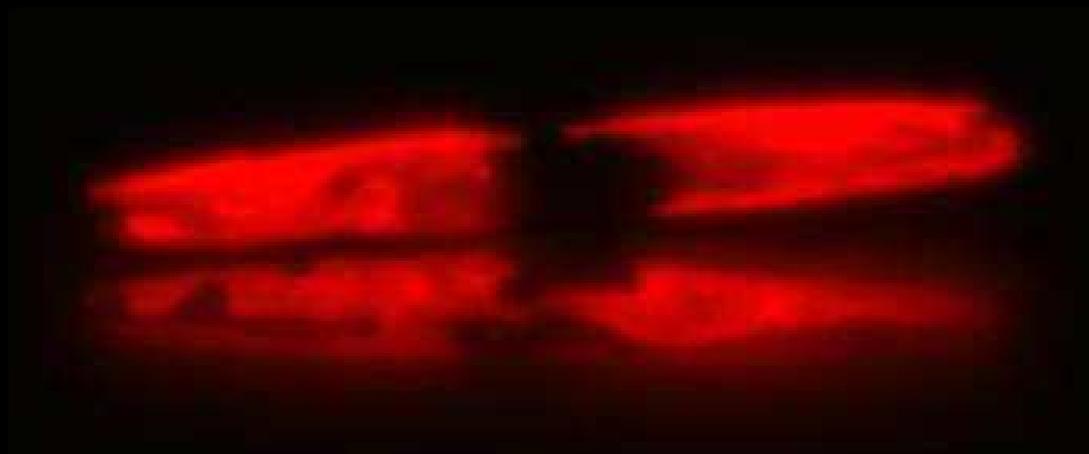
3.3. Interaction avec les bactéries

3.4. Toxicité cuivre

4. Conclusions et perspectives



# Matériel et méthodes



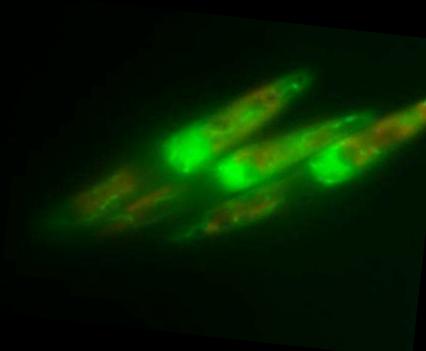
# Outils de mesure physiologique



Photosynthèse → QY, FL3  
(contenu en chlorophylle)



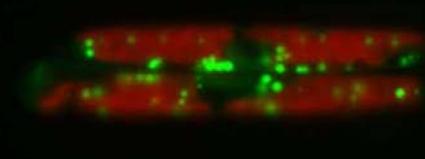
Energie disponible



Métabolisme primaire →  
activité des estérases (FDA)

Division →  
comptage  
cellulaire et  
viabilité (SYTOX  
Green)

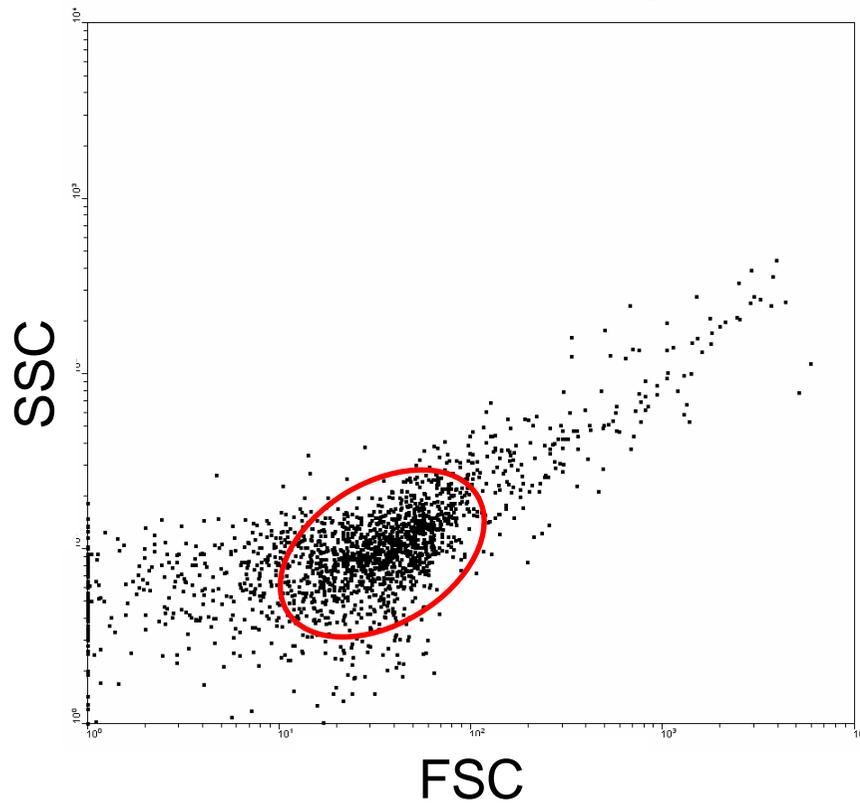
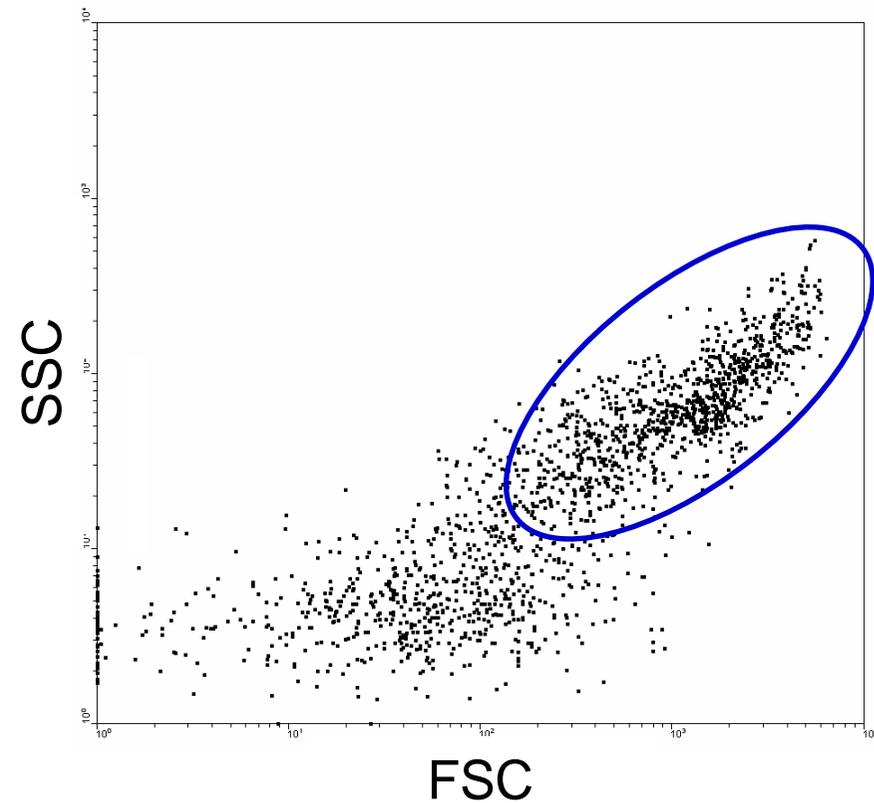
Métabolisme  
secondaire →  
production d'AD (kit  
ELISA)

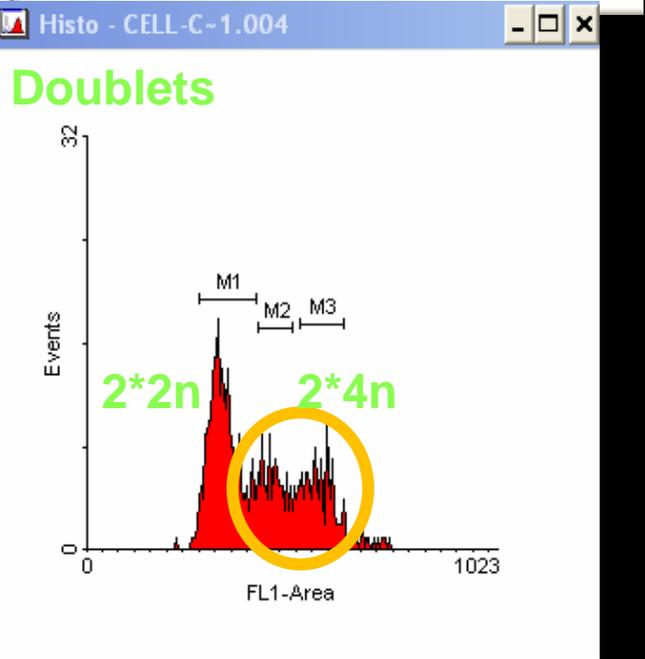
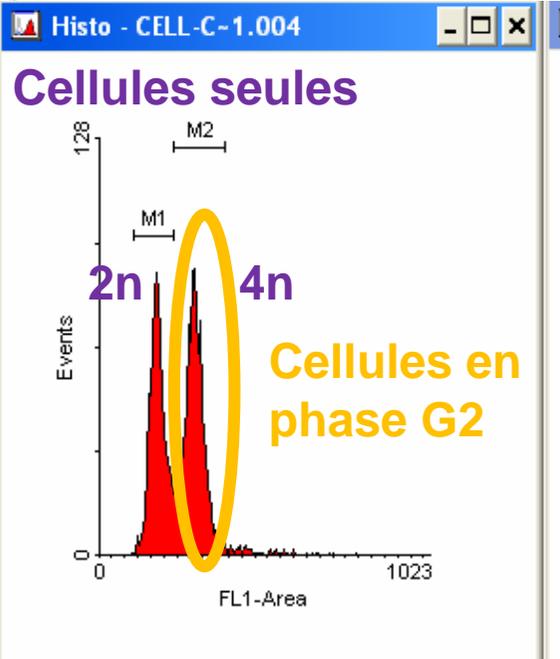
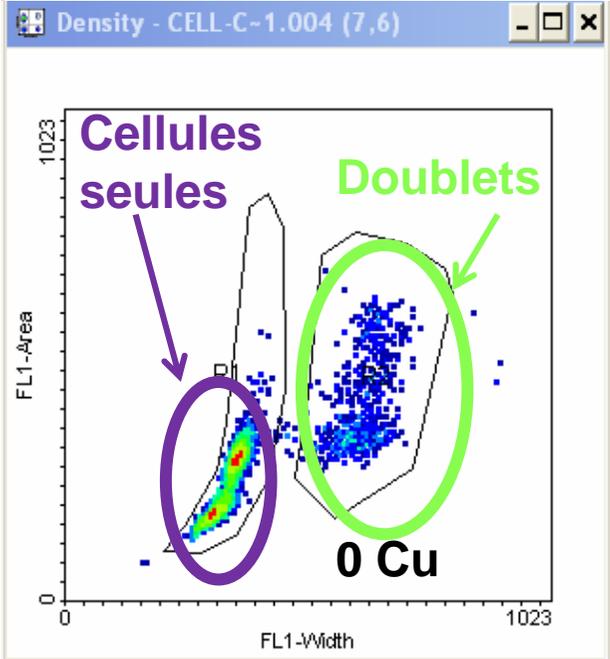
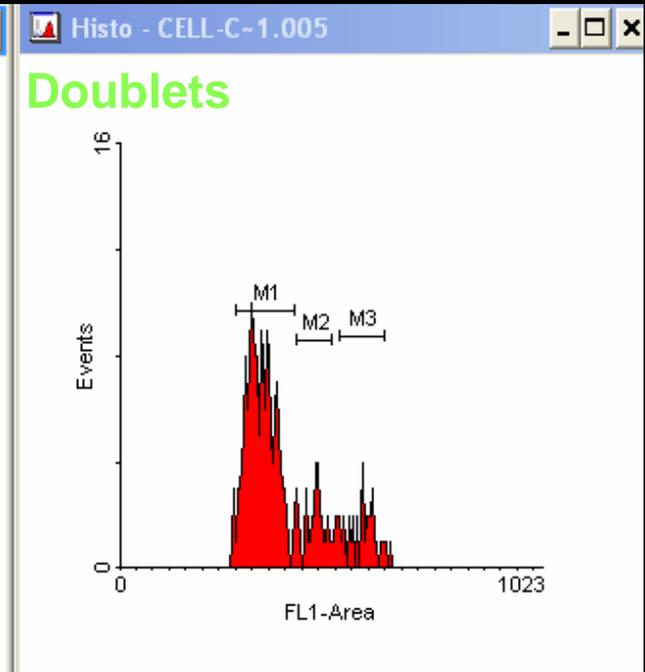
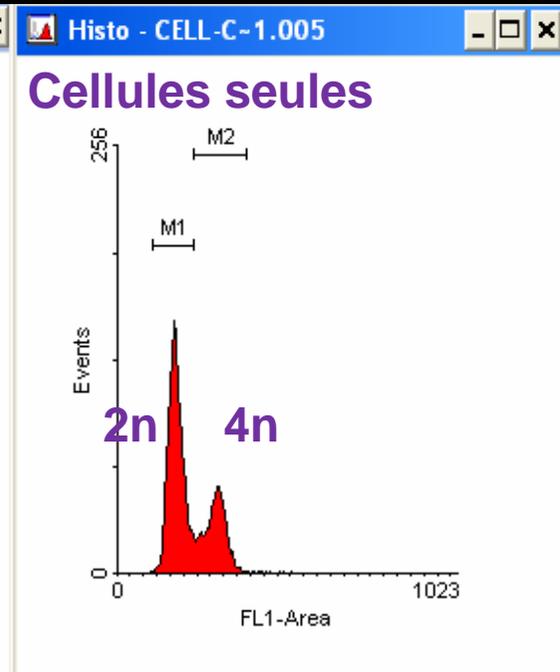
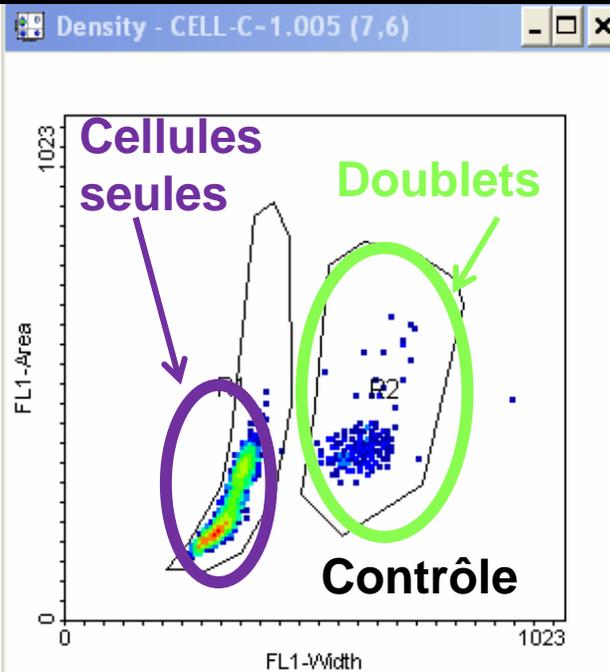


Stockage  
d'énergie  
(lipides de  
réserve,  
BODIPY)

## 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

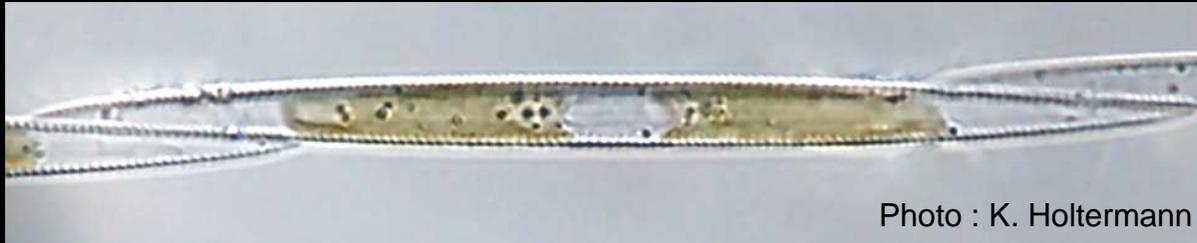


Photo : K. Holtermann

*Pseudo-nitzschia delicatissima* Pd08RB

→ non productrice d'acide domoïque



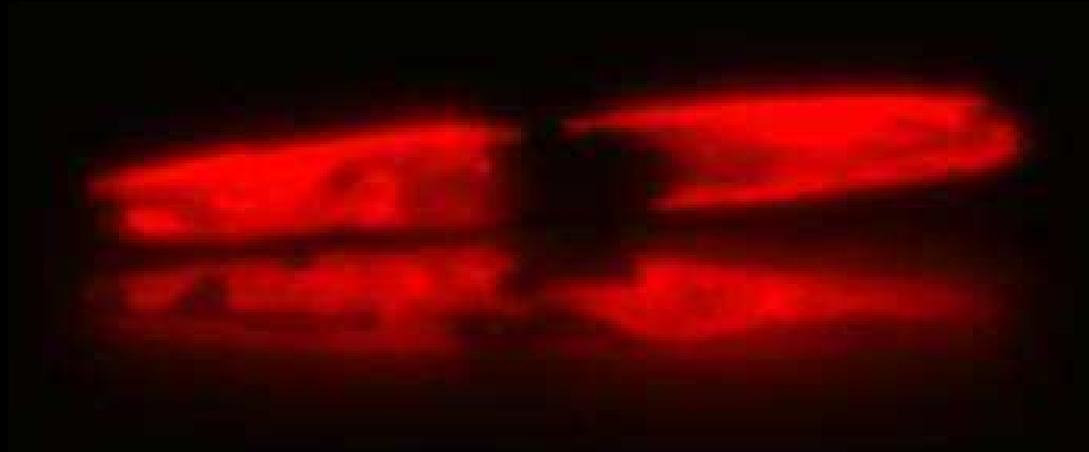
Photo : A. Lelong

*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



ELSEVIER



INSTITUT PASTEUR

Research in Microbiology 162 (2011) 969–981

[www.elsevier.com/locate/resmic](http://www.elsevier.com/locate/resmic)

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

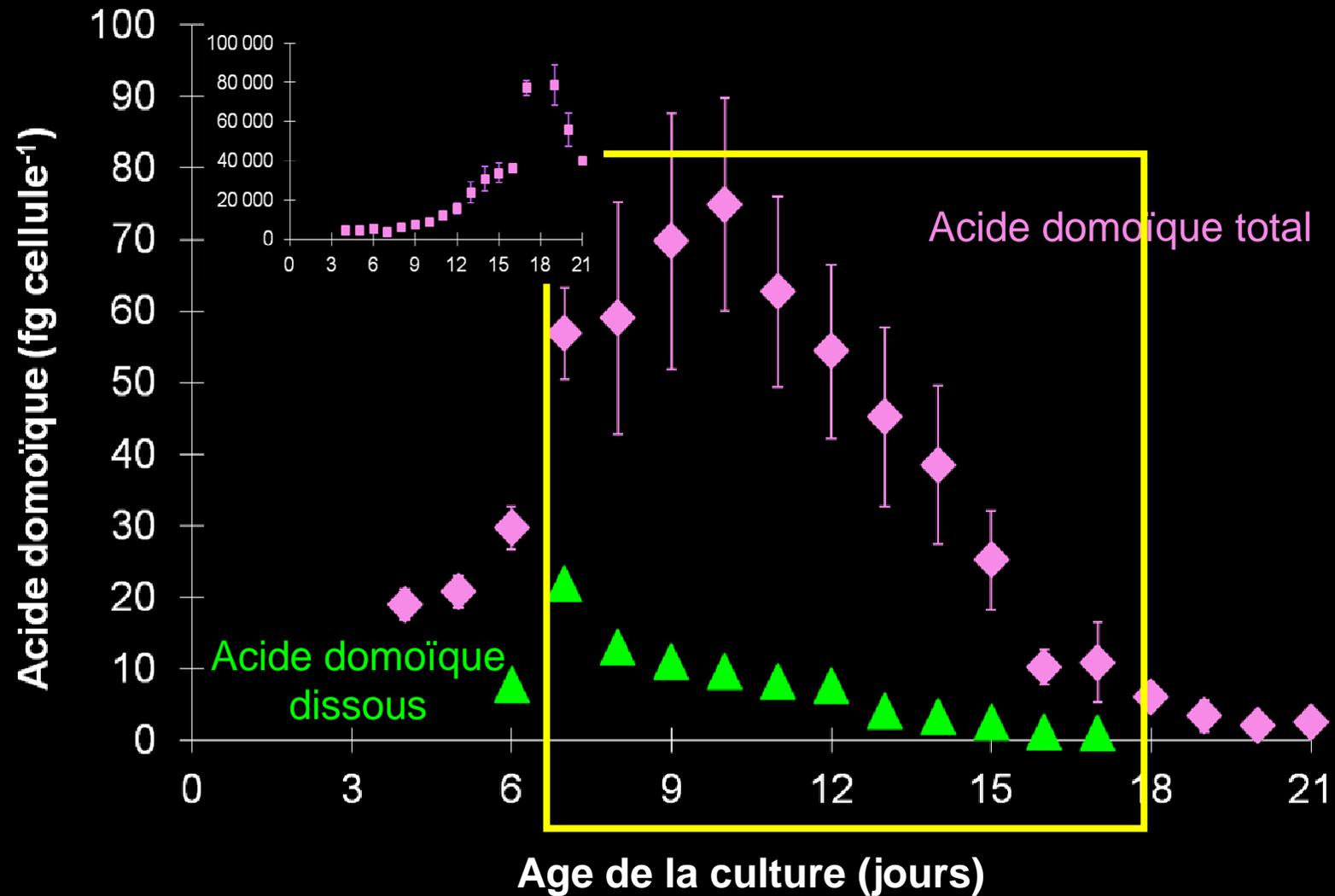
Aurélie Lelong, Hélène Hégaret, Philippe Soudant\*

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

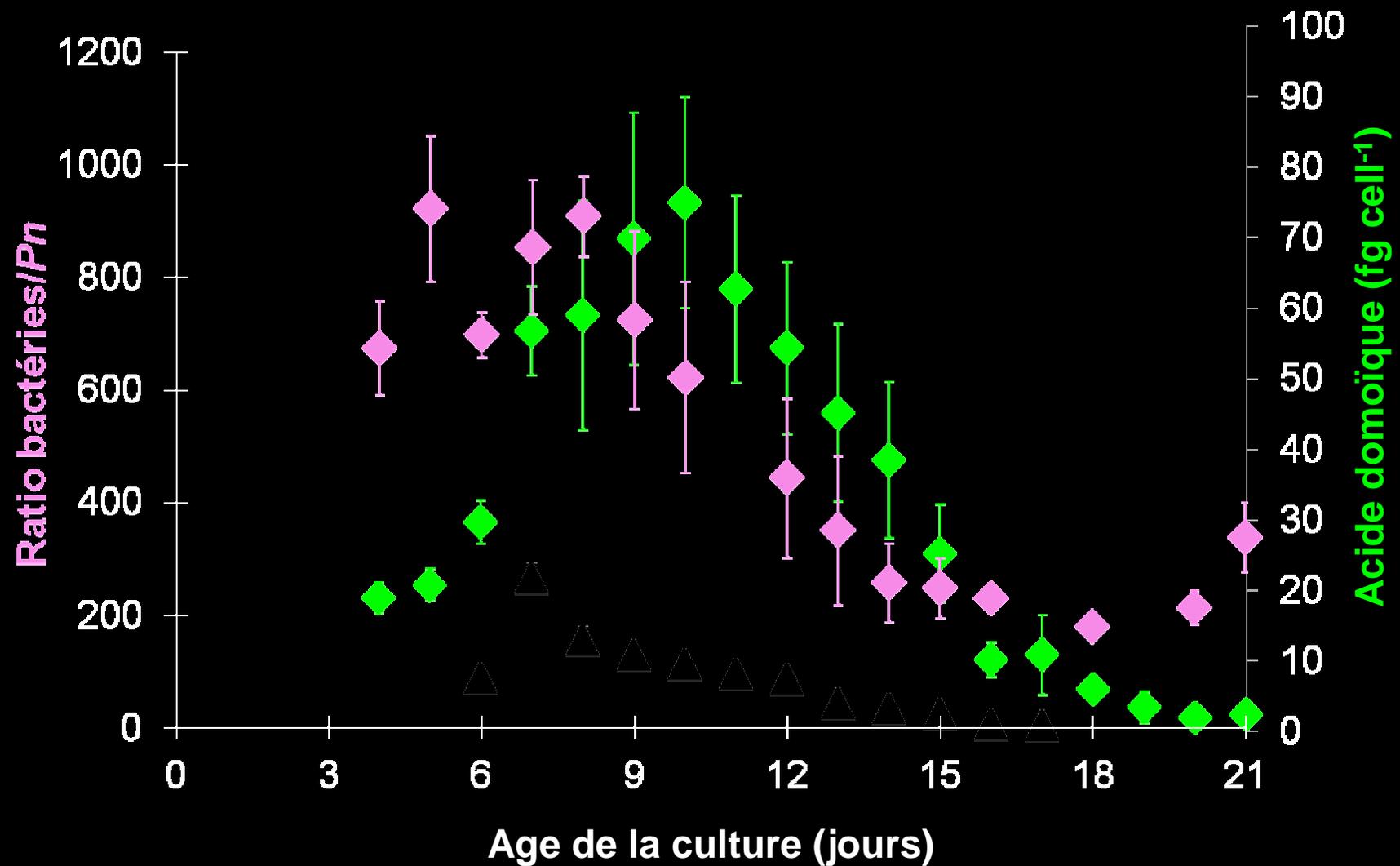
Received 5 January 2011; accepted 9 May 2011

Available online 13 June 2011

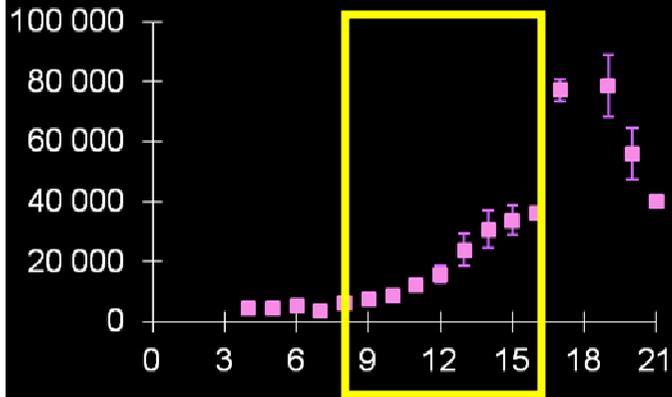
## 3.1. Physiologie cellulaire

**Acide domoïque = métabolisme secondaire**

## 3.1. Physiologie cellulaire

Ratio bactéries/*P. multiseri*

3.1. Physiologie cellulaire



Photosynthèse

Energie disponible

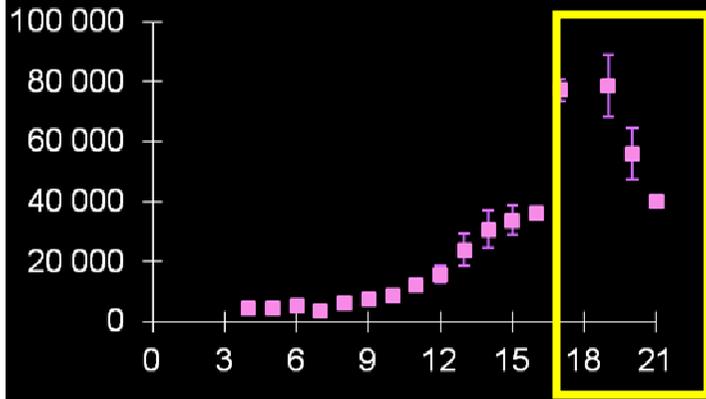
Métabolisme primaire

Division

Métabolisme secondaire

Stockage d'énergie (lipides)

3.1. Physiologie cellulaire



Photosynthèse

Energie disponible

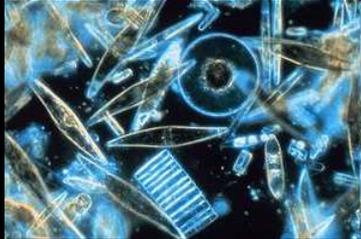
Carence(s)

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)

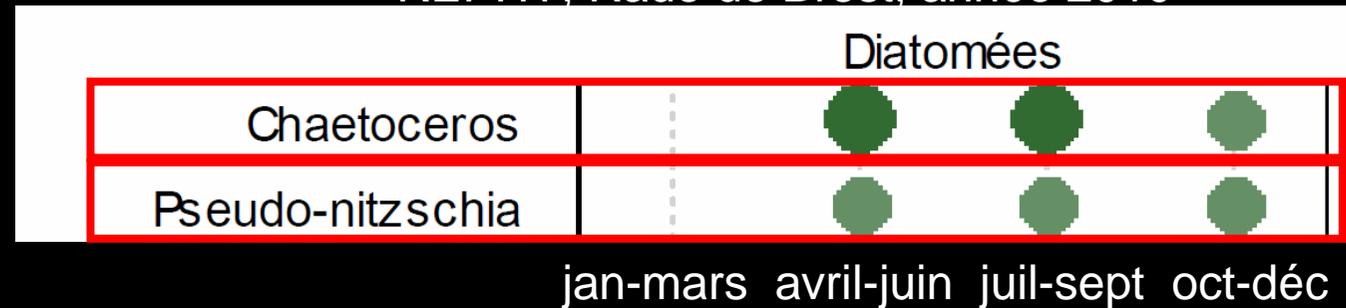


→ **production d'AD**

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

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

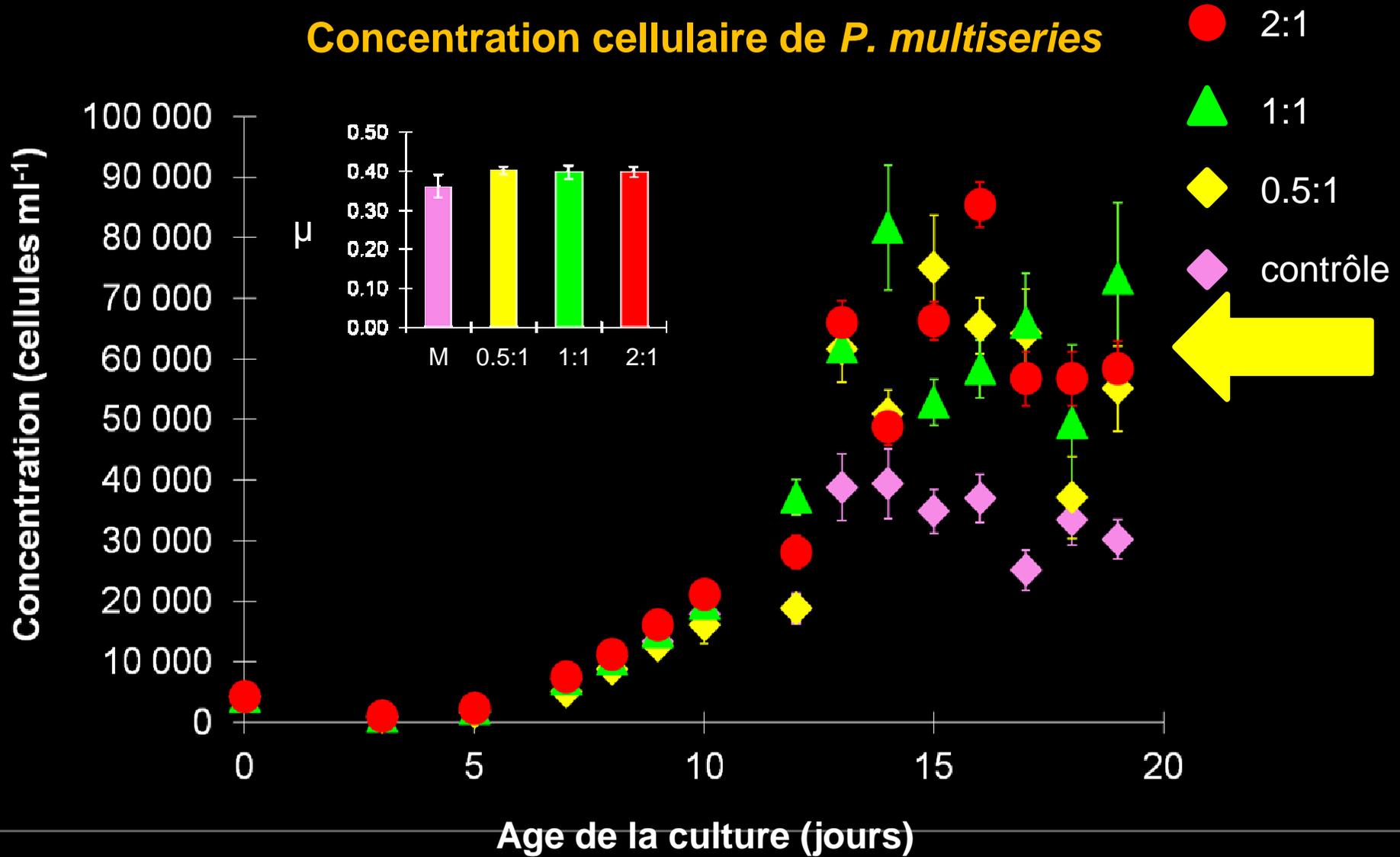
REPHY, Rade de Brest, année 2010



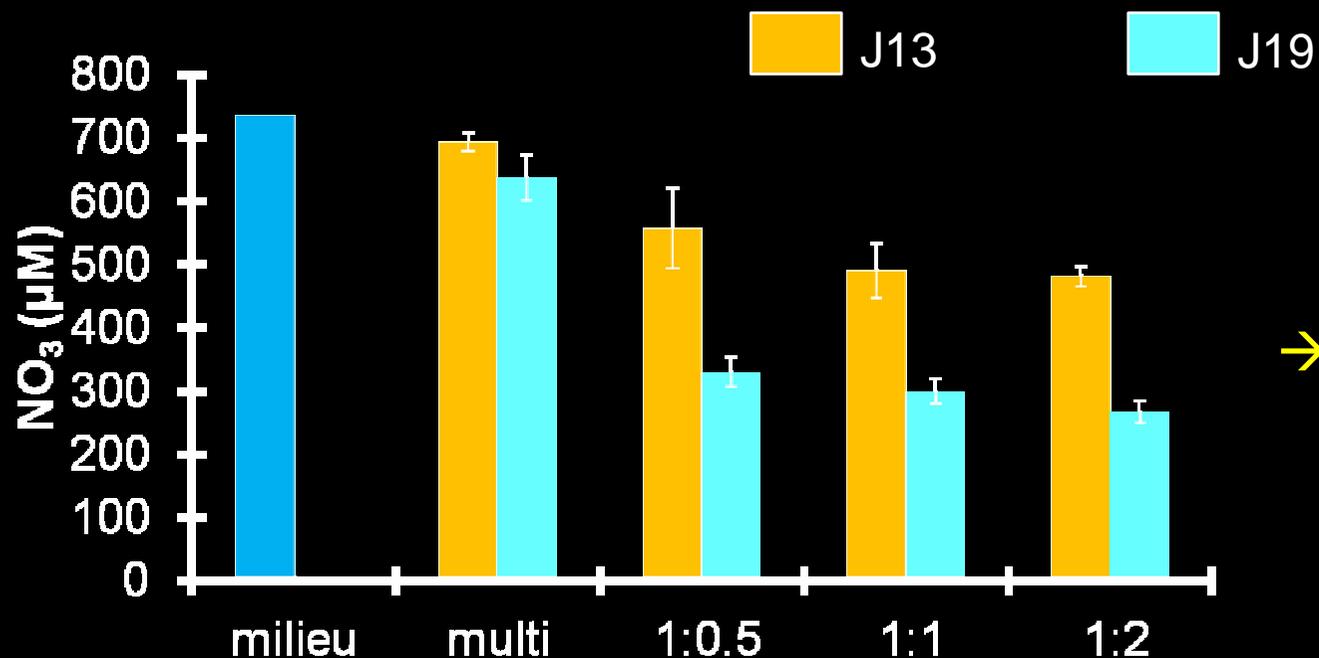
→ L'interaction entre ces deux espèces induit-elle des modifications physiologiques, dont la production d'AD ?

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

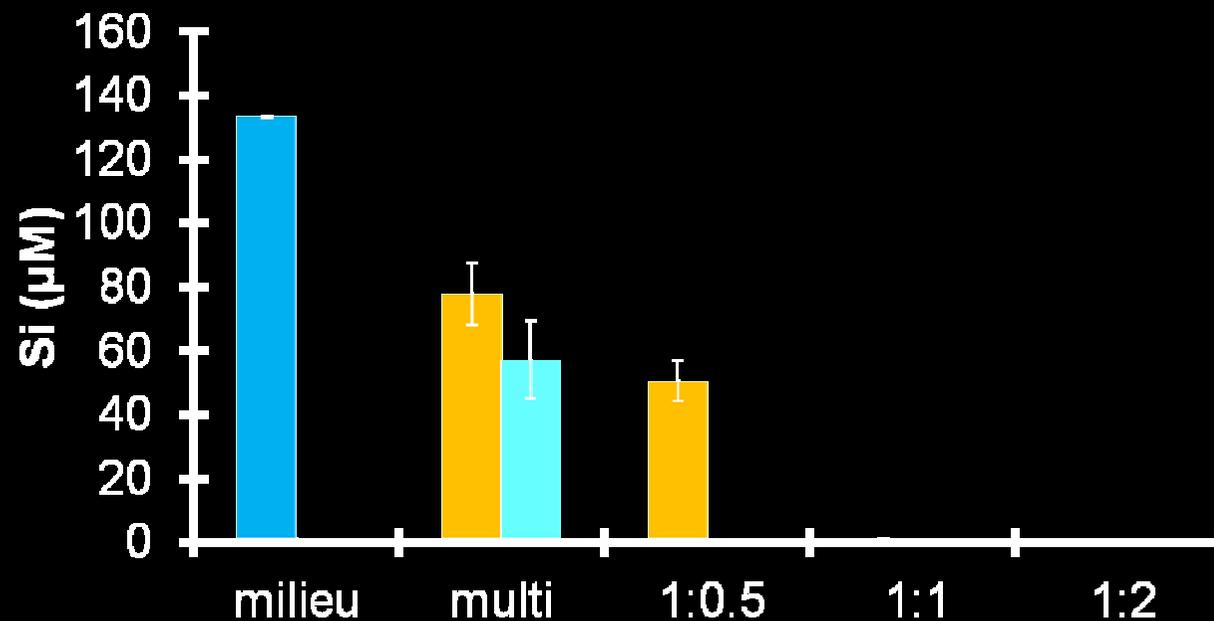
Concentration cellulaire de *P. multiseriis*



→ Concentration maximale plus importante

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

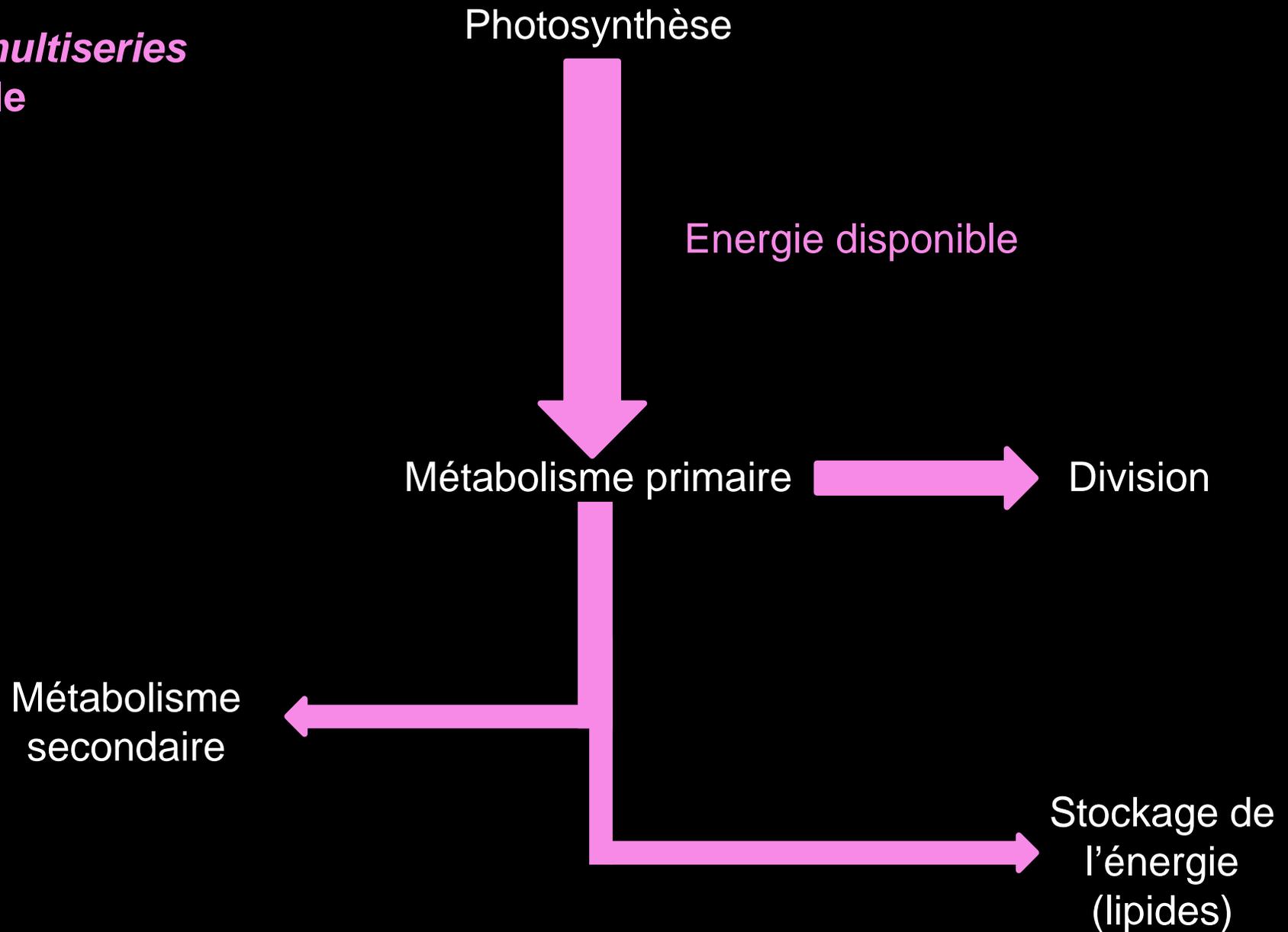
→ Pas de limitation  $\text{NO}_3^-$



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

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

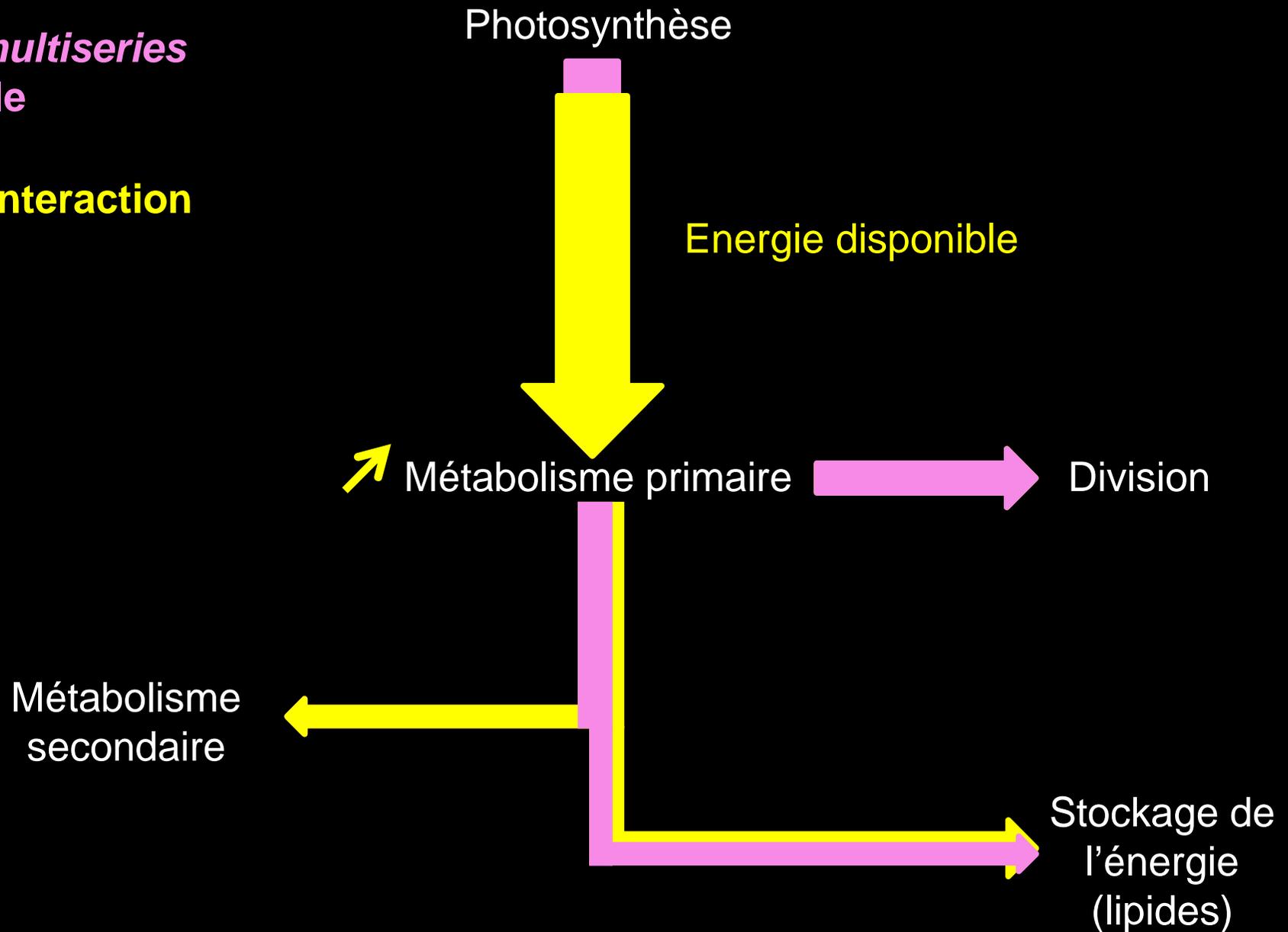
*P. multiseriis*  
seule



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 ?

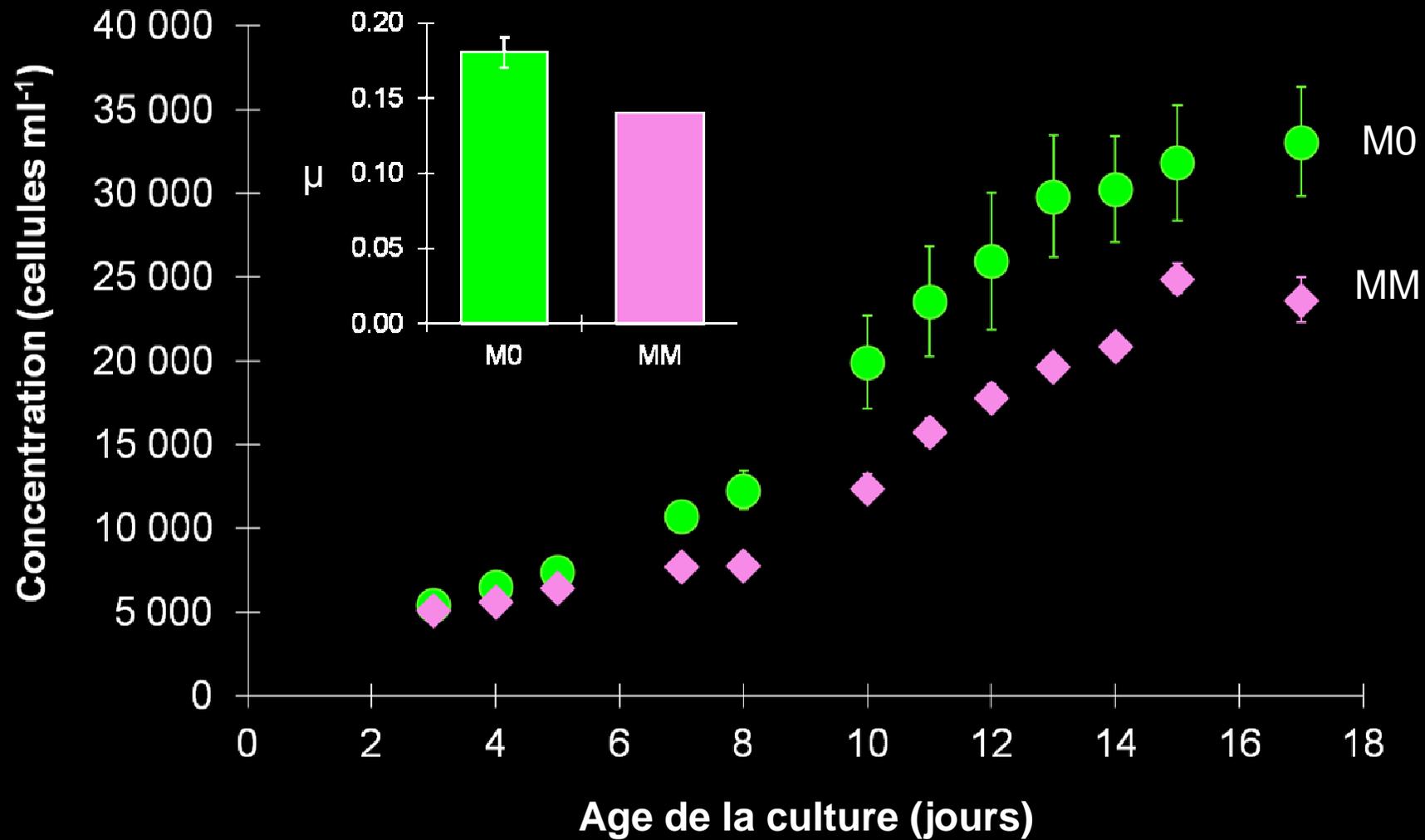
→ La toxicité (ou non toxicité) est-elle liée à la communauté bactérienne associée ?

3.3. Interaction *Pseudo-nitzschia* - bactéries

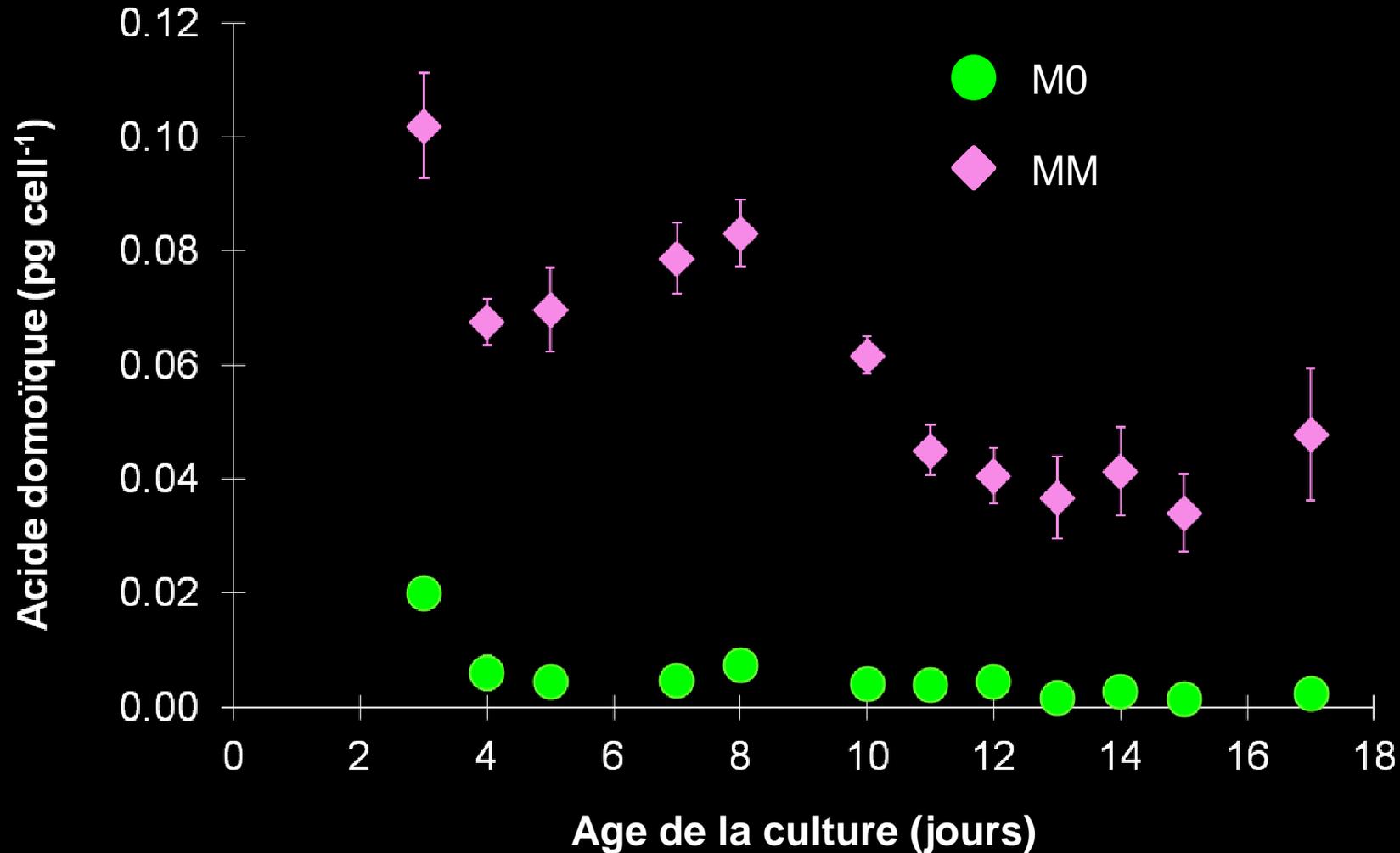
- *P. multiseriis* → quasi-axénique (bactéries en partie éliminées avec des antibiotiques) = M0
- ◆ *P. multiseriis* → avec ses propres bactéries = MM
- ▲ *P. multiseriis* → avec les bactéries de *P. delicatissima* (non-toxique) = MD

3.3. Interaction *Pseudo-nitzschia* - bactéries

## Concentration cellulaire



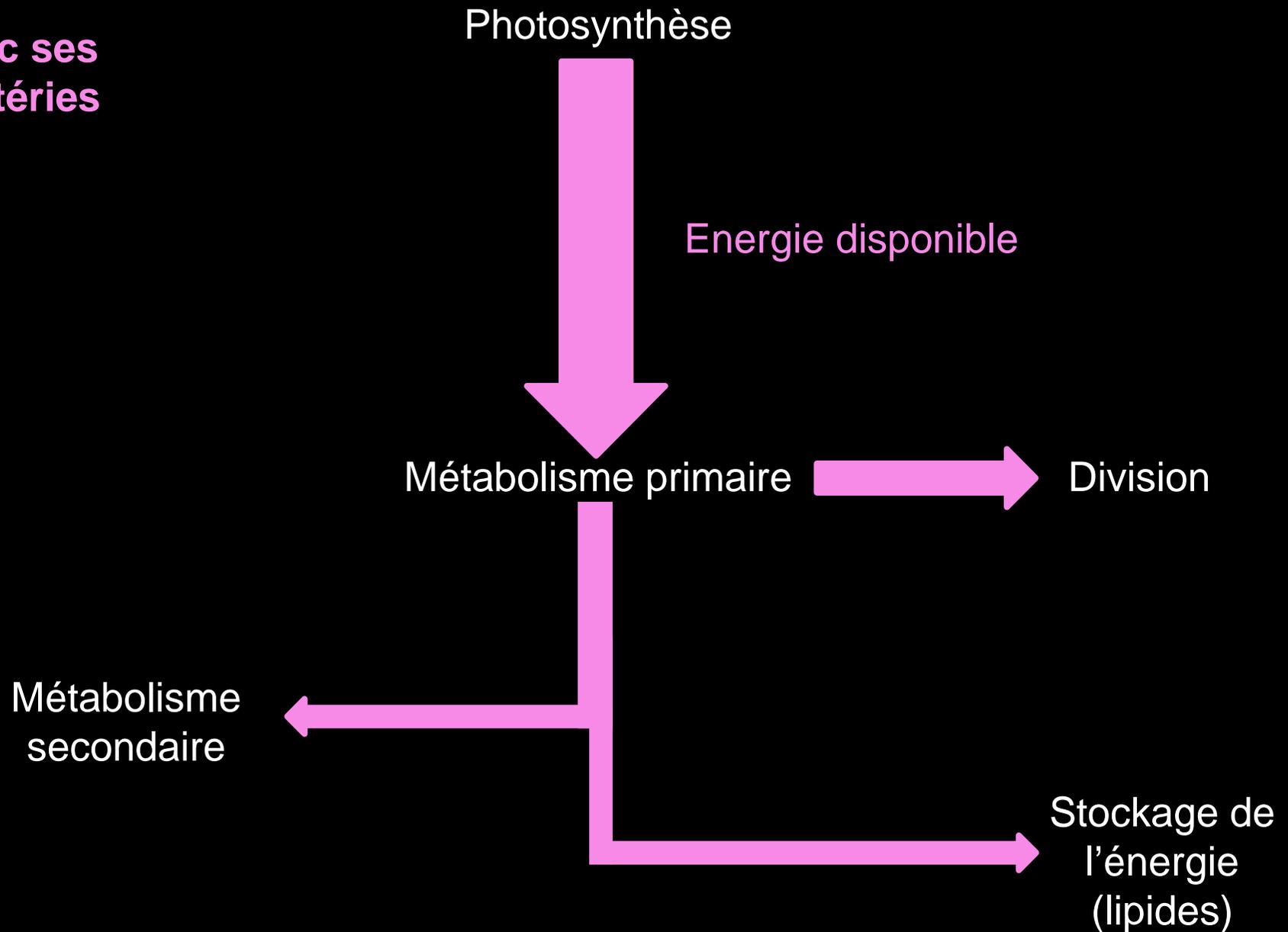
→ - de bactéries = meilleure croissance

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

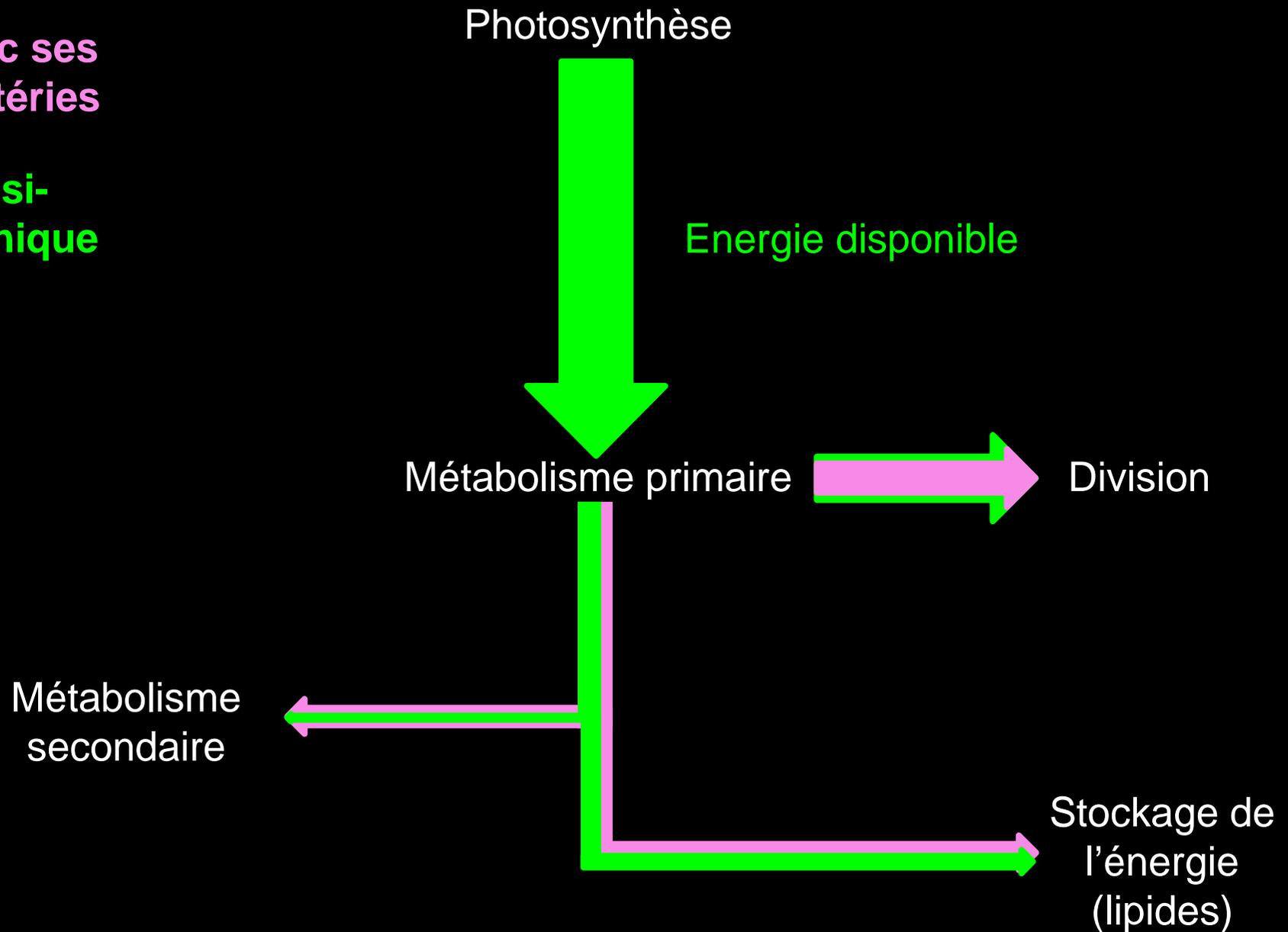
Avec ses  
bactéries



3.3. Interaction *Pseudo-nitzschia* - bactéries

Avec ses  
bactéries

Quasi-  
axénique



3.3. Interaction *Pseudo-nitzschia* - bactéries

Quasi-axénique

Photosynthèse

~~Certaines bactéries~~

Pas de stimulation ?  
Pas de sidérophores ?

Métabolisme primaire

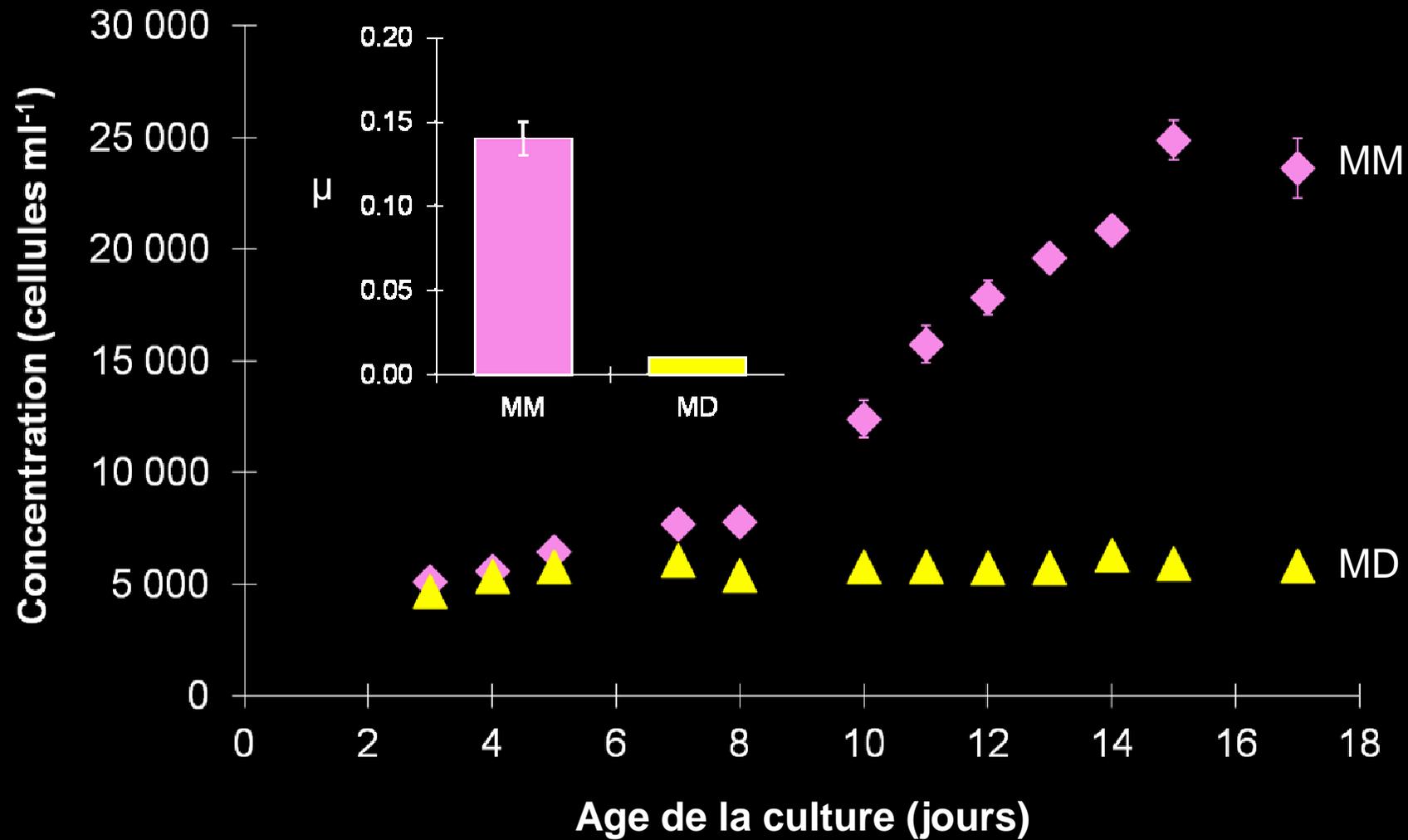
Division

Métabolisme secondaire

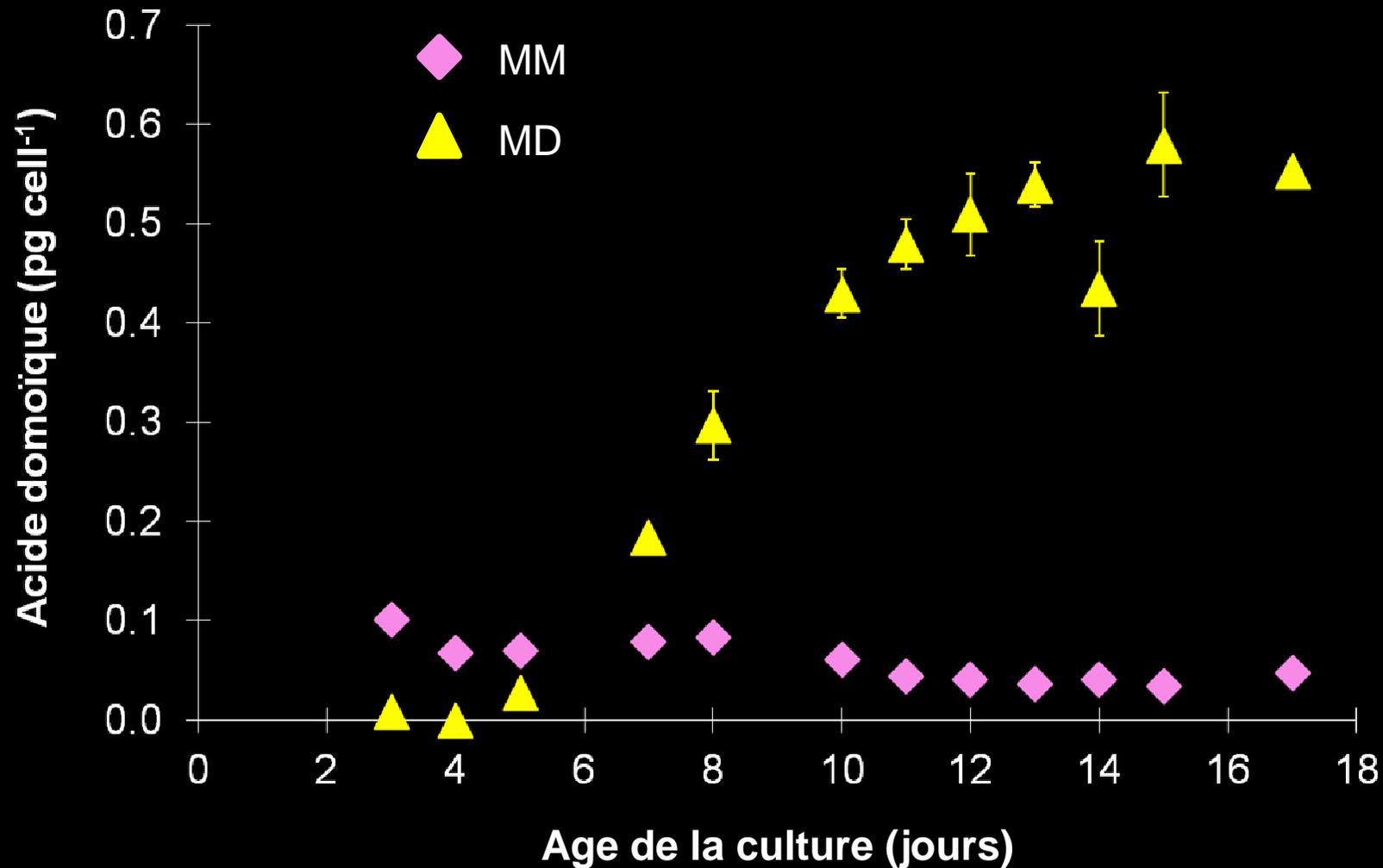
Stockage de l'énergie (lipides)

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**

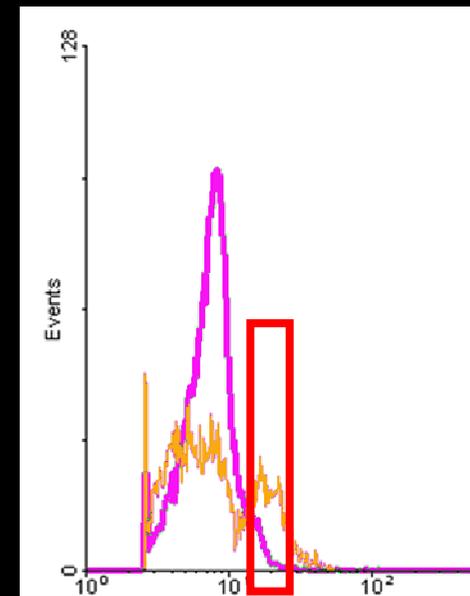
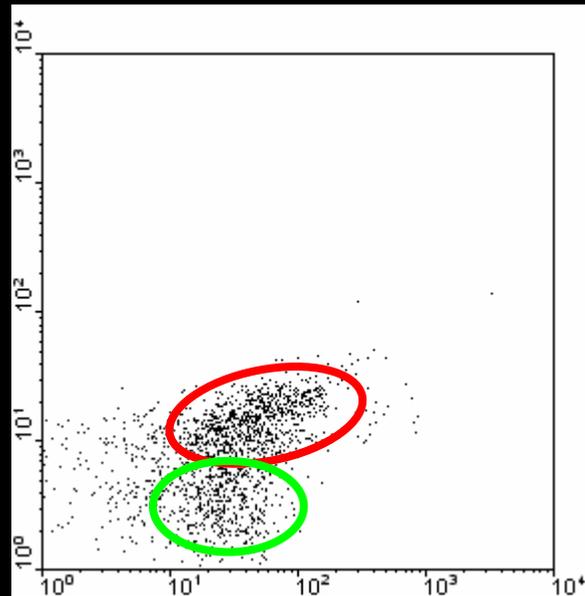
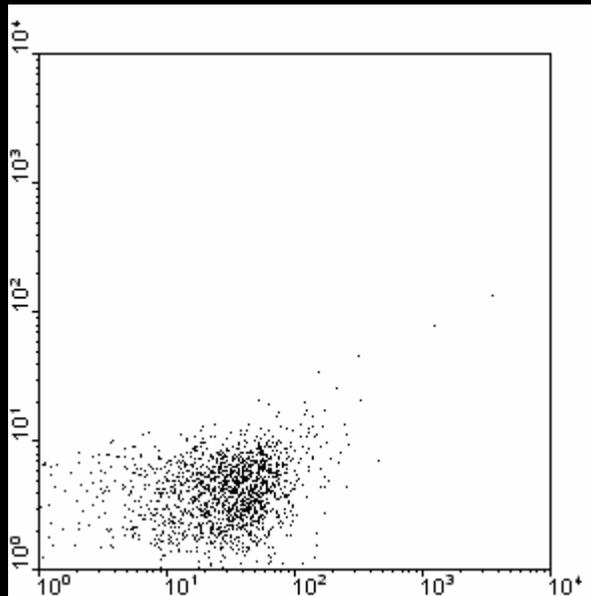
→ bactéries d'une autre espèce = très forte production d'AD (x16)

3.3. Interaction *Pseudo-nitzschia* - bactéries

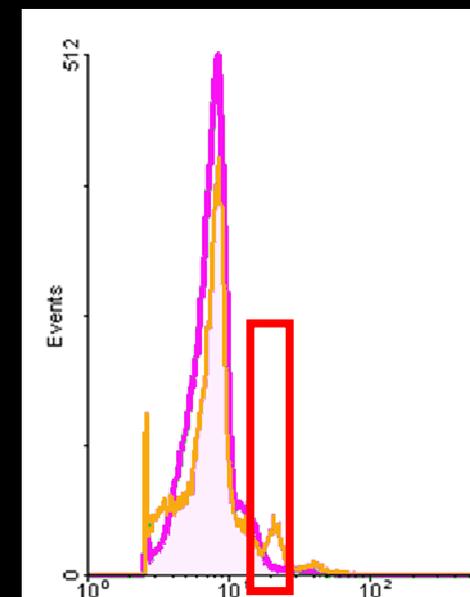
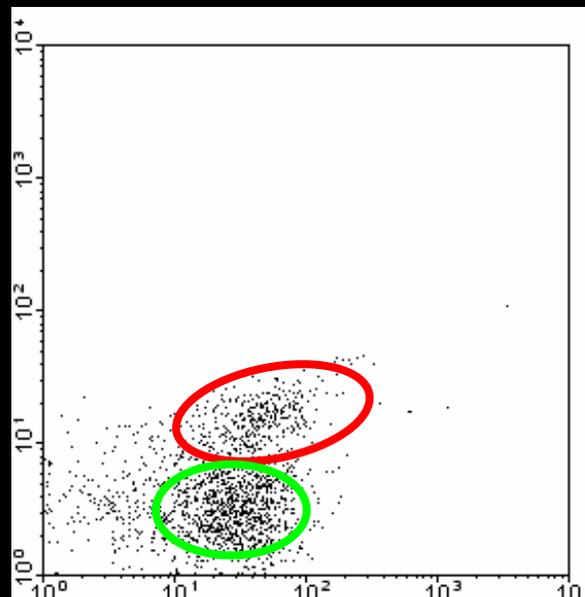
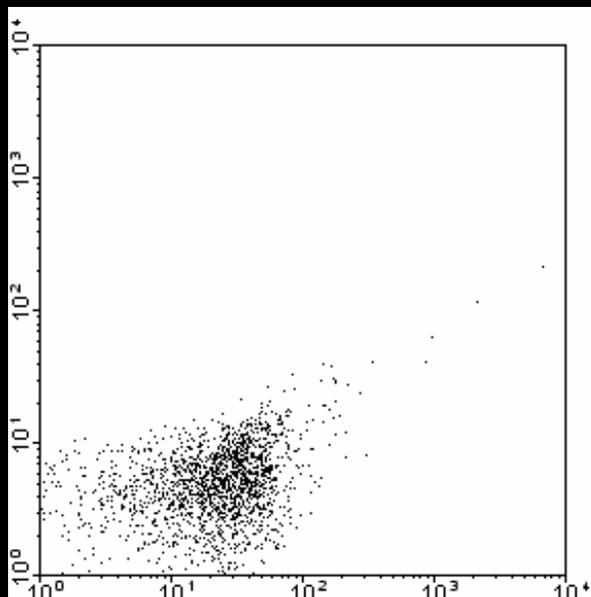
MM

MD

J7  
SSC



J15  
SSC



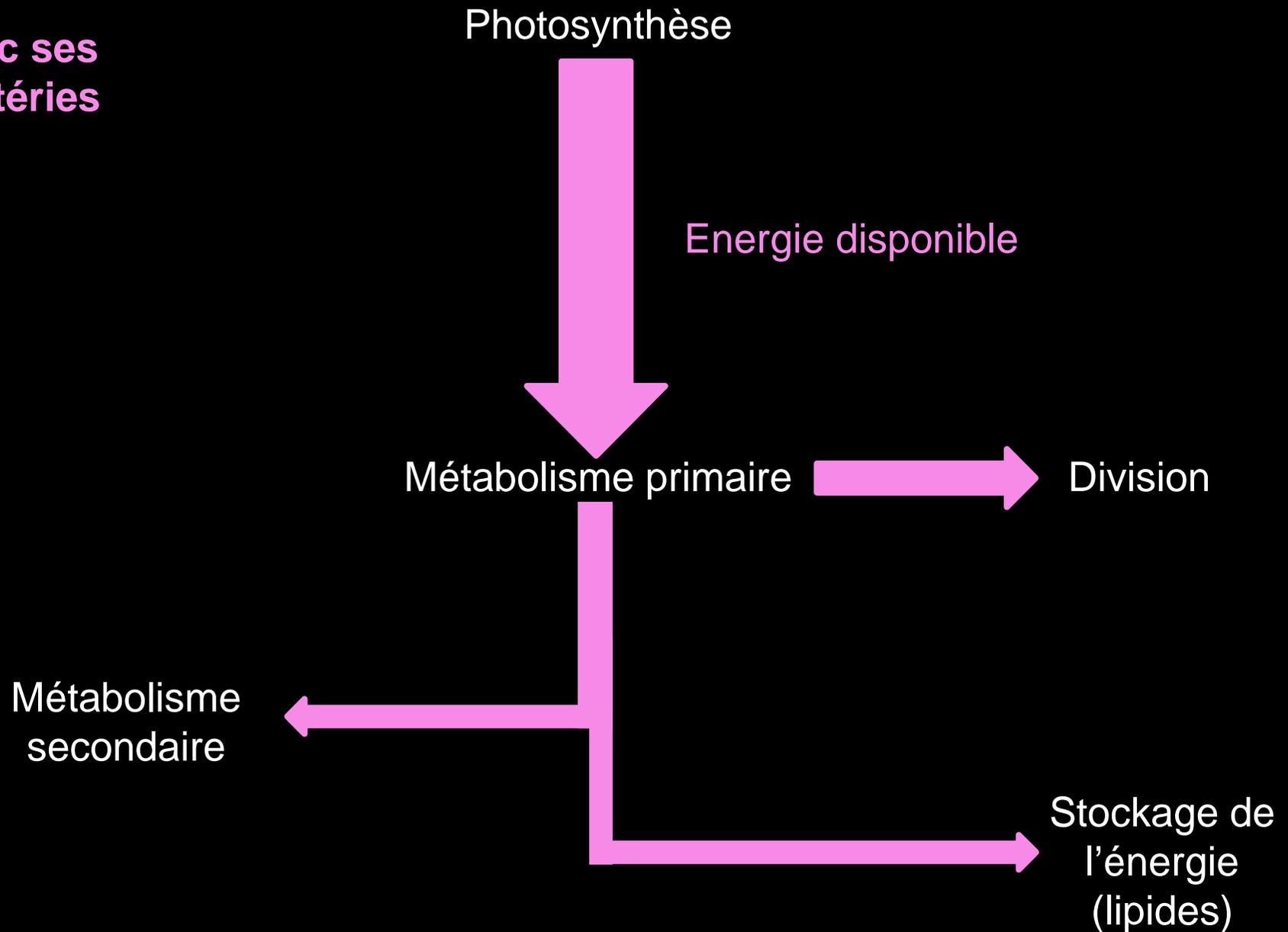
FSC

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

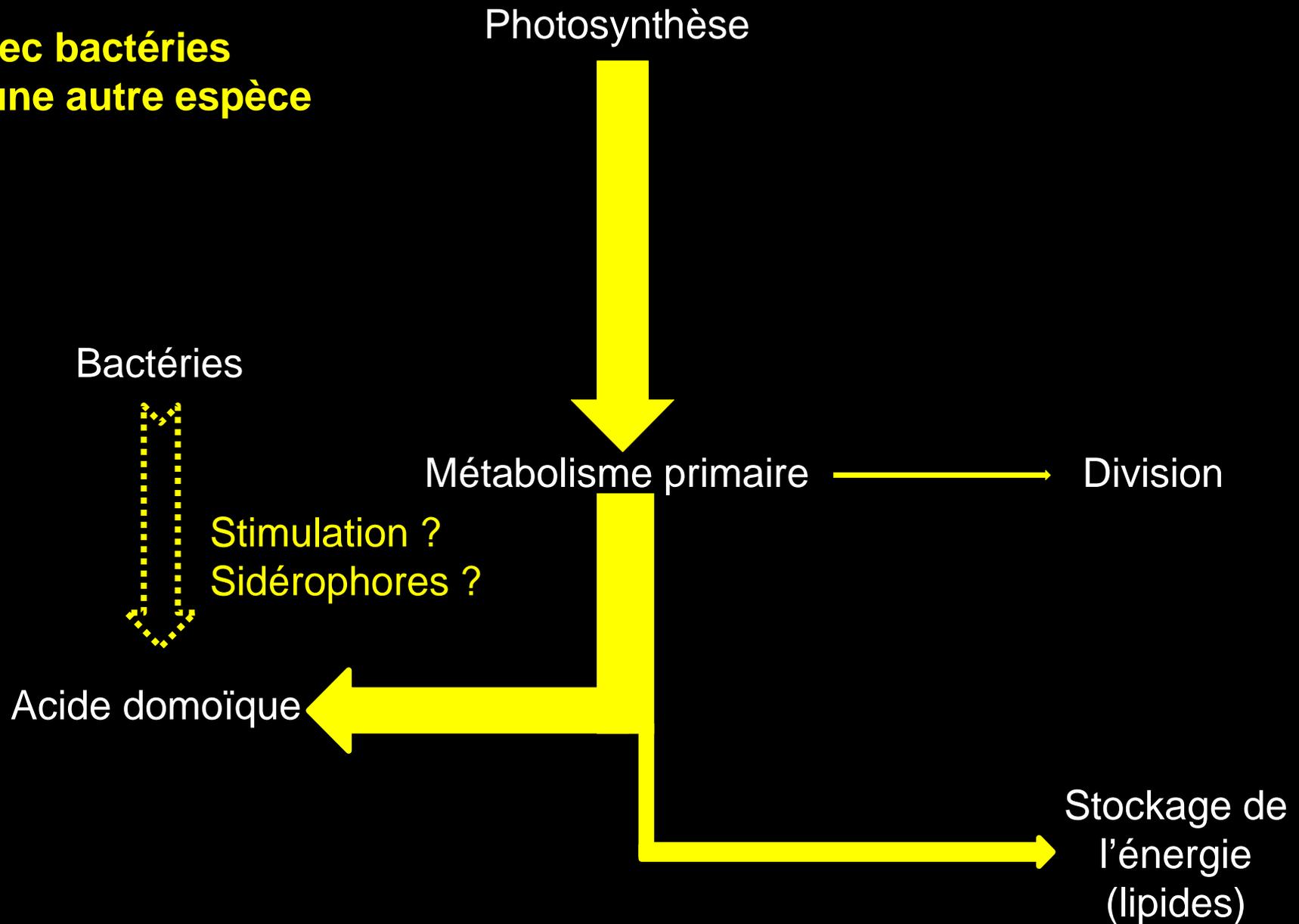
Division

Métabolisme  
secondaire

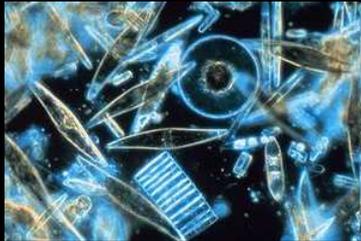
Stockage de  
l'énergie  
(lipides)

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)

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



→ **production d'AD**

### 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* + ~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

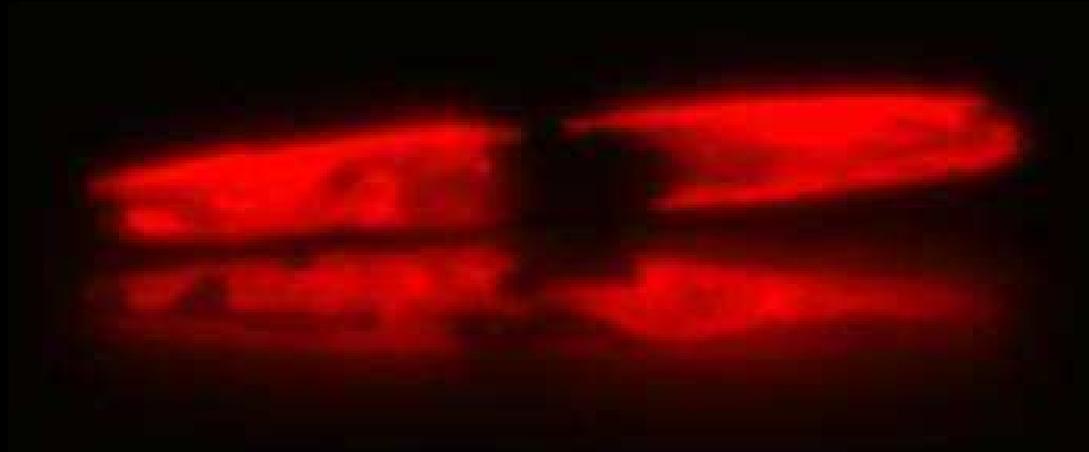
Métabolisme  
secondaire



Stockage de  
l'énergie  
(lipides)



# Conclusions et perspectives



4. Conclusions et perspectives

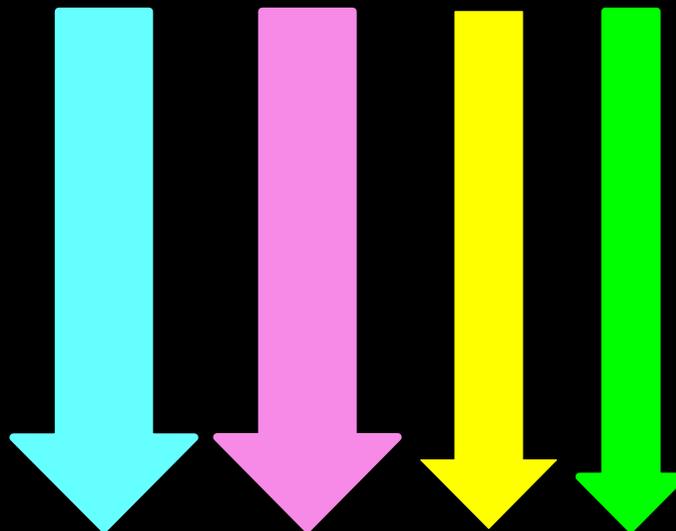
Interaction

- de bactéries

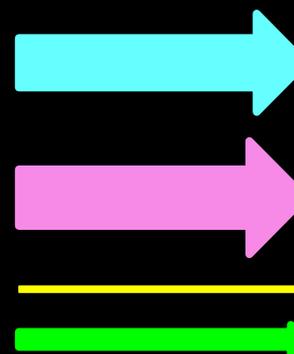
Avec bactéries  
d'une autre espèce

+ Cu

Photosynthèse

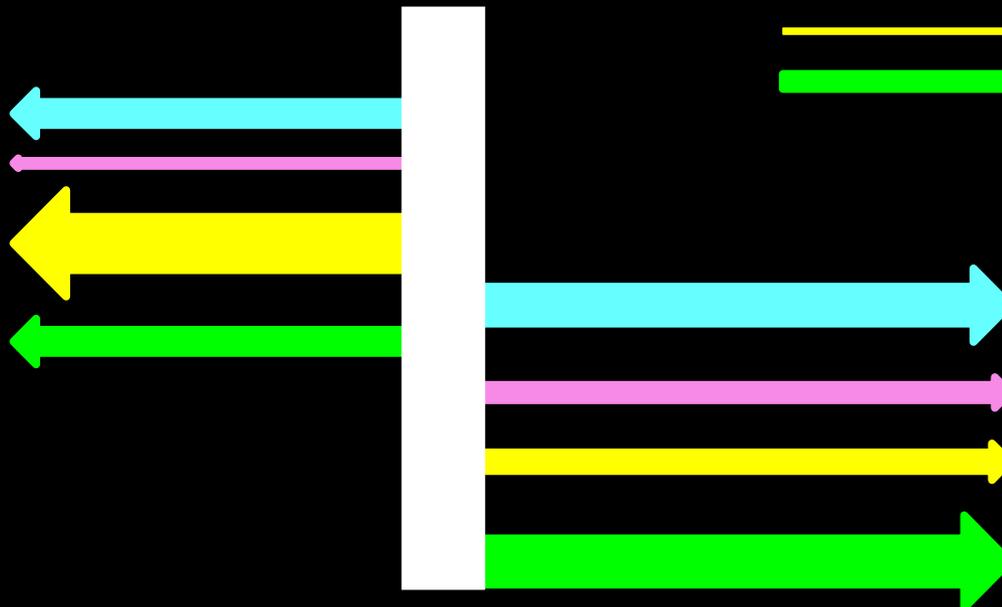


Métabolisme primaire



Division

Acide domoïque

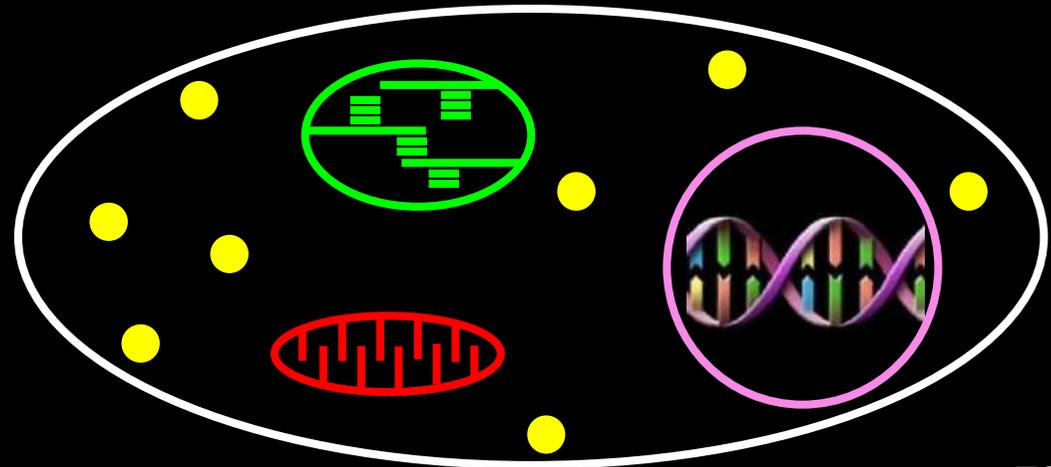


Stockage de  
l'énergie  
(lipides)

## 4. Conclusions et perspectives

**Améliorer la compréhension des réponses physiologiques :**

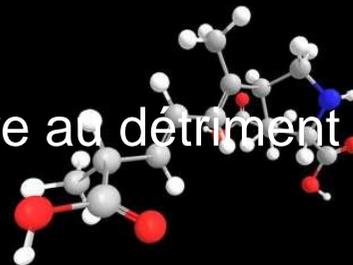
- Photosynthèse,
- Réarrangement des glycolipides des membranes des thylakoïdes,
- Synthèse d'ATP, respiration,
- Cycle cellulaire,
- Stockage d'énergie : polysaccharides,  
triglycérides,
- Expression de gènes et protéines (impliqués dans  
les réponses physiologiques),
- ...



## 4. Conclusions et perspectives

**→ Quel est le rôle de l'AD ?**

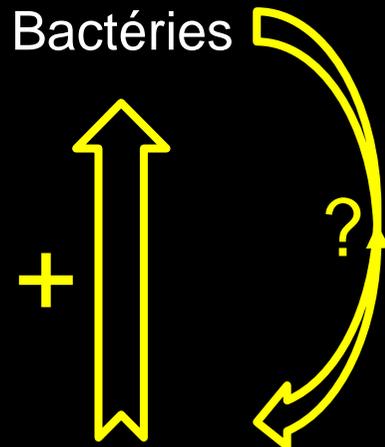
- Reste difficile à appréhender.
- Aucun effet allélopathique (Lundholm et al. 2005), ne protège pas du broutage par le zooplancton (Thessen et al. 2010) et très peu d'effets connus sur les filtreurs.
- Ne confère pas d'avantage lors d'une interaction avec une autre diatomée.
- Ne protège pas d'une toxicité 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

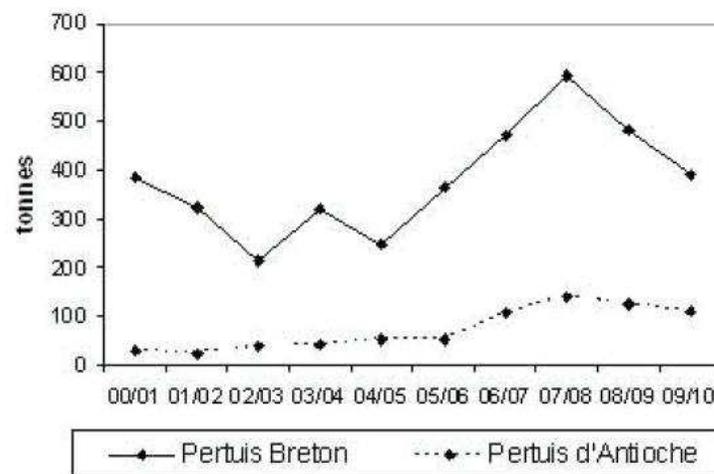
Campagnes annuelles réglementées d'octobre à février.

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

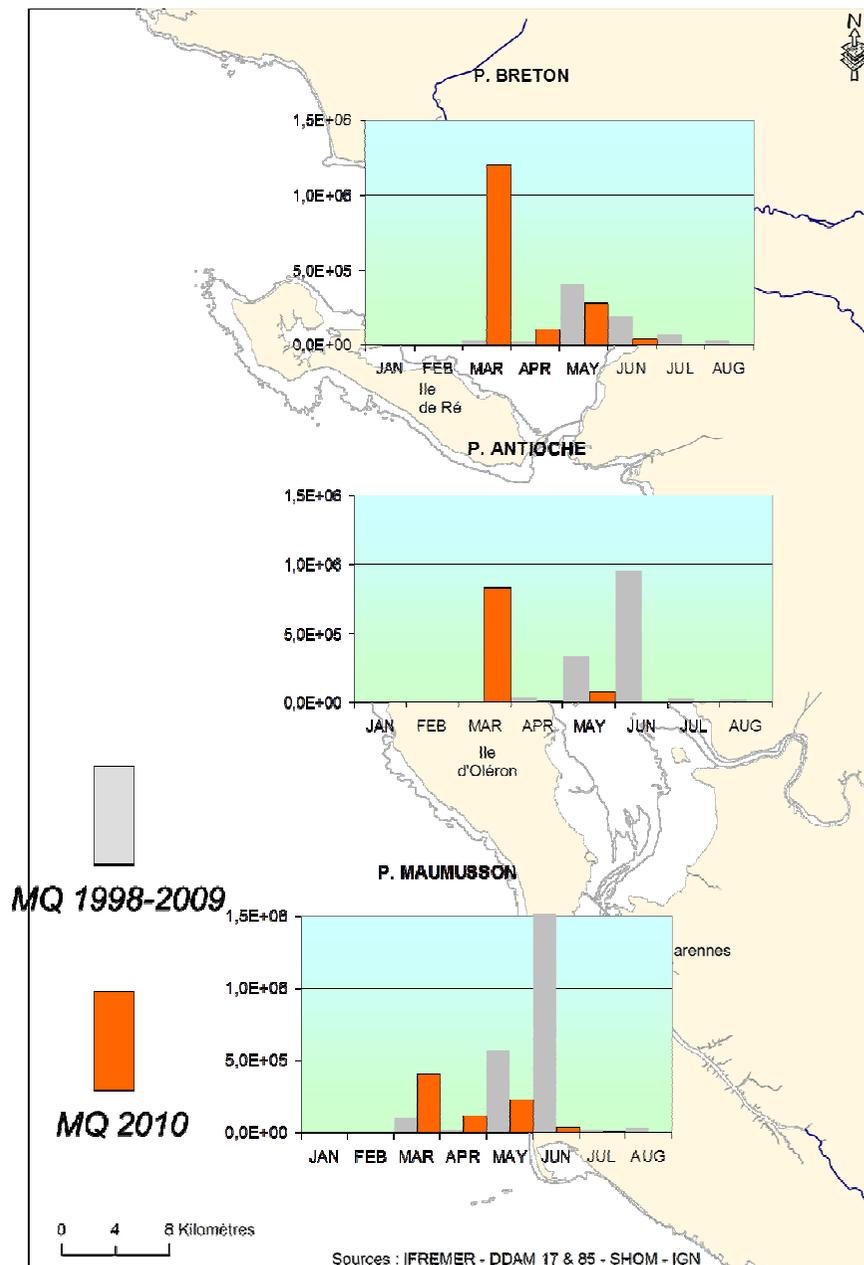
Contamination en deux temps par *Pseudo-nitzschia australis* :

- 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

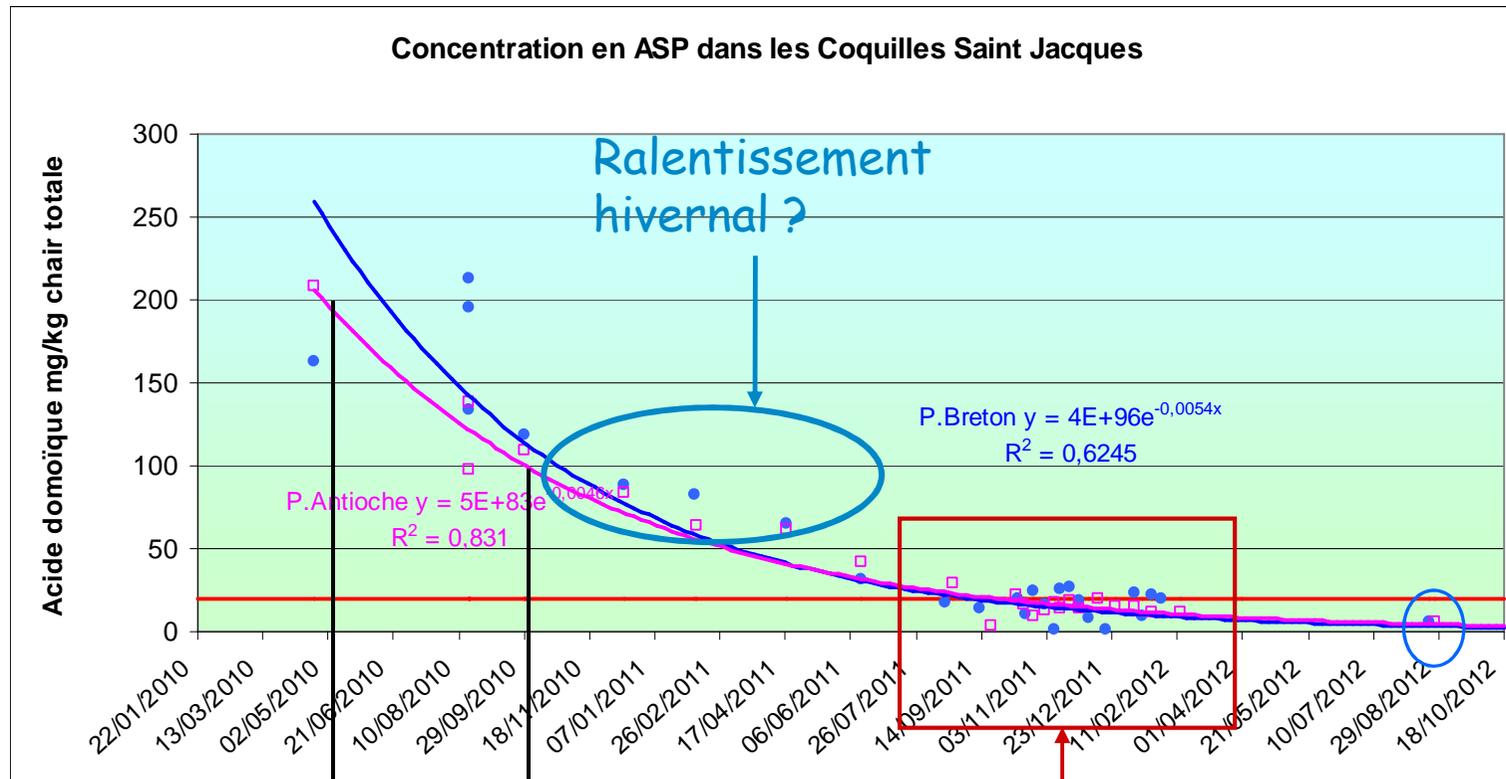
Pas de dépassement des seuils d'alerte en 2011 et 2012



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

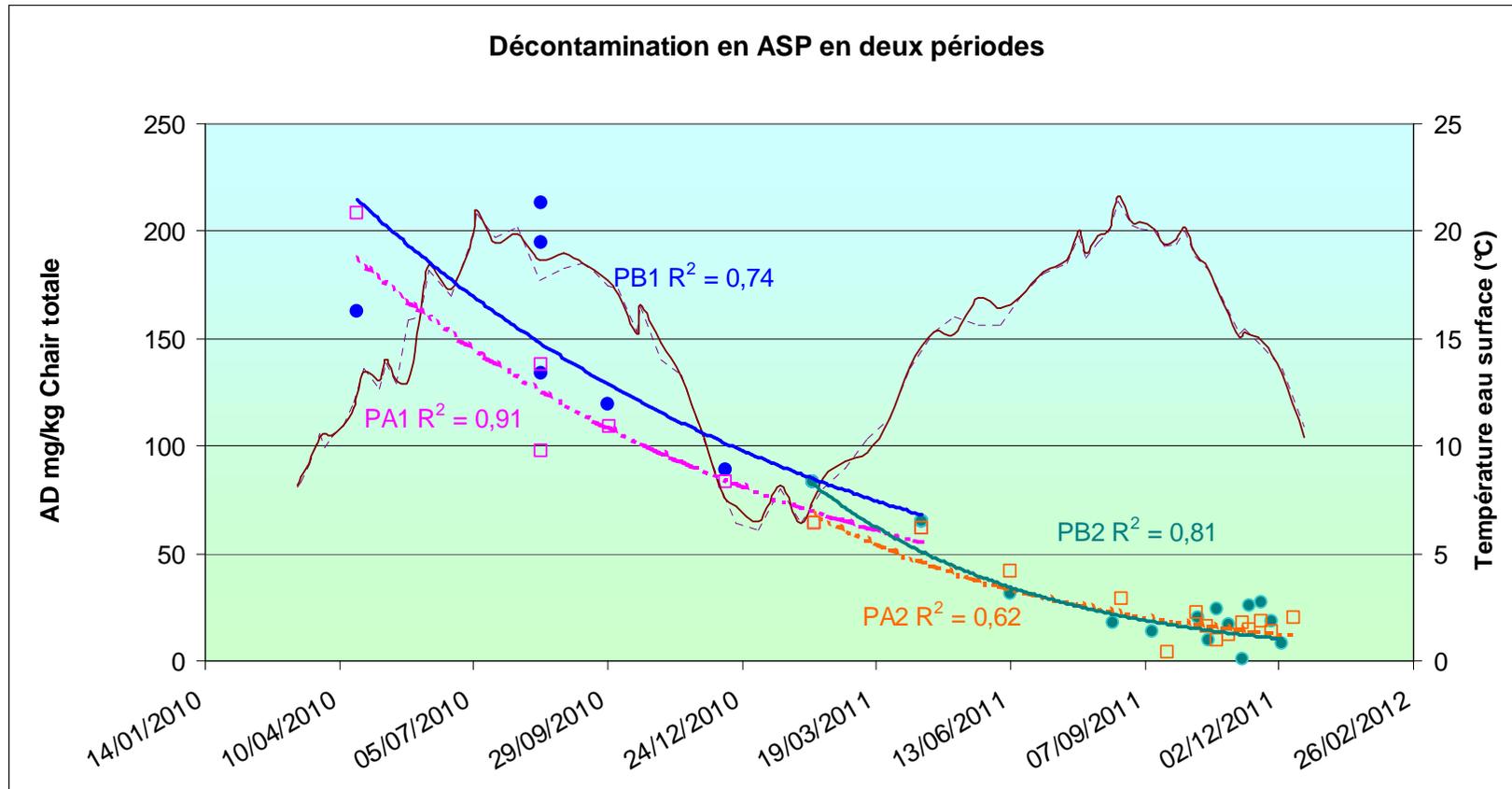
Journées REPHY 26-27 septembre 2012 NANTES

# Décontamination (naturelle)



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

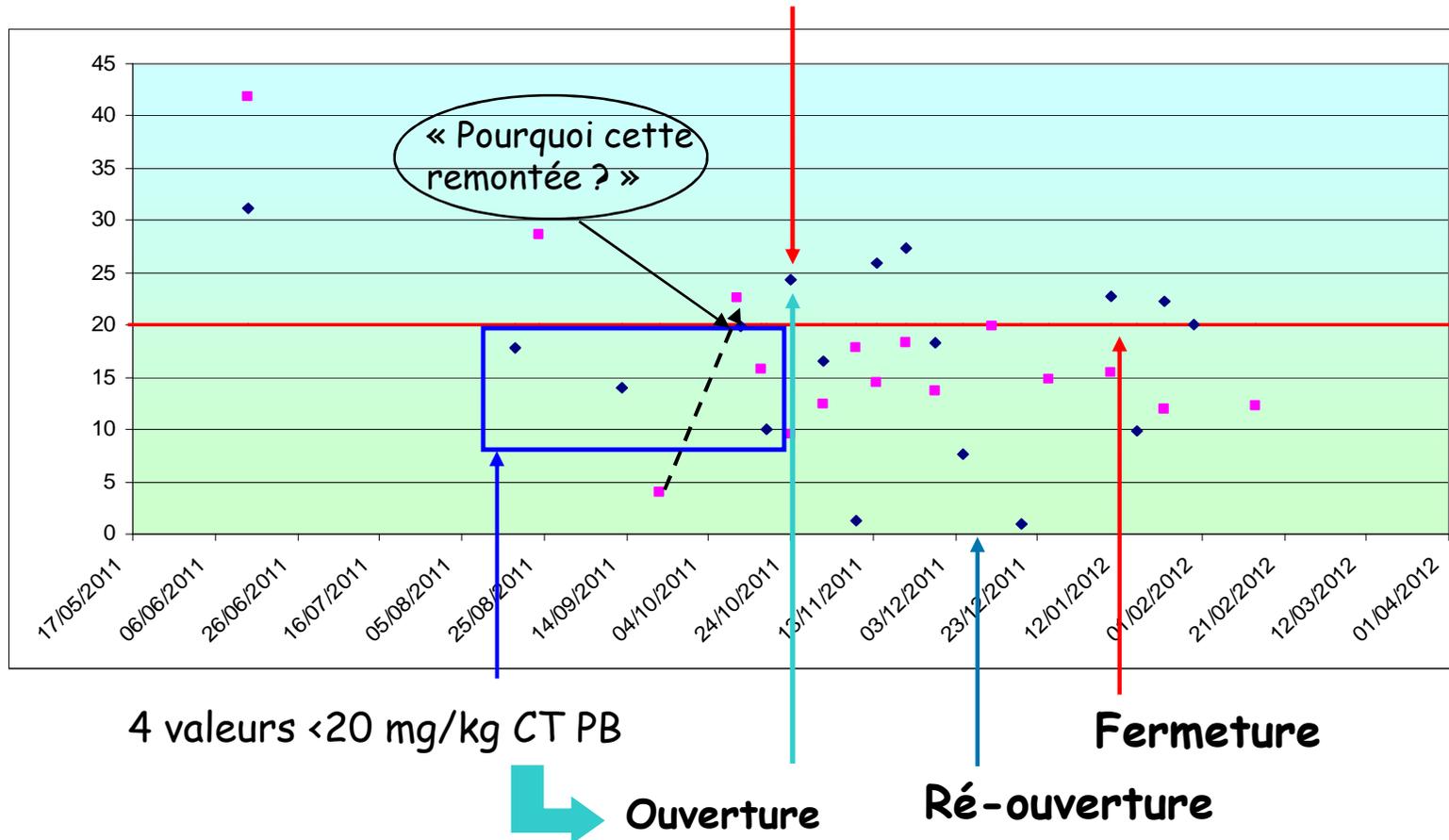
# Ralentissement hivernal ?



# 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?

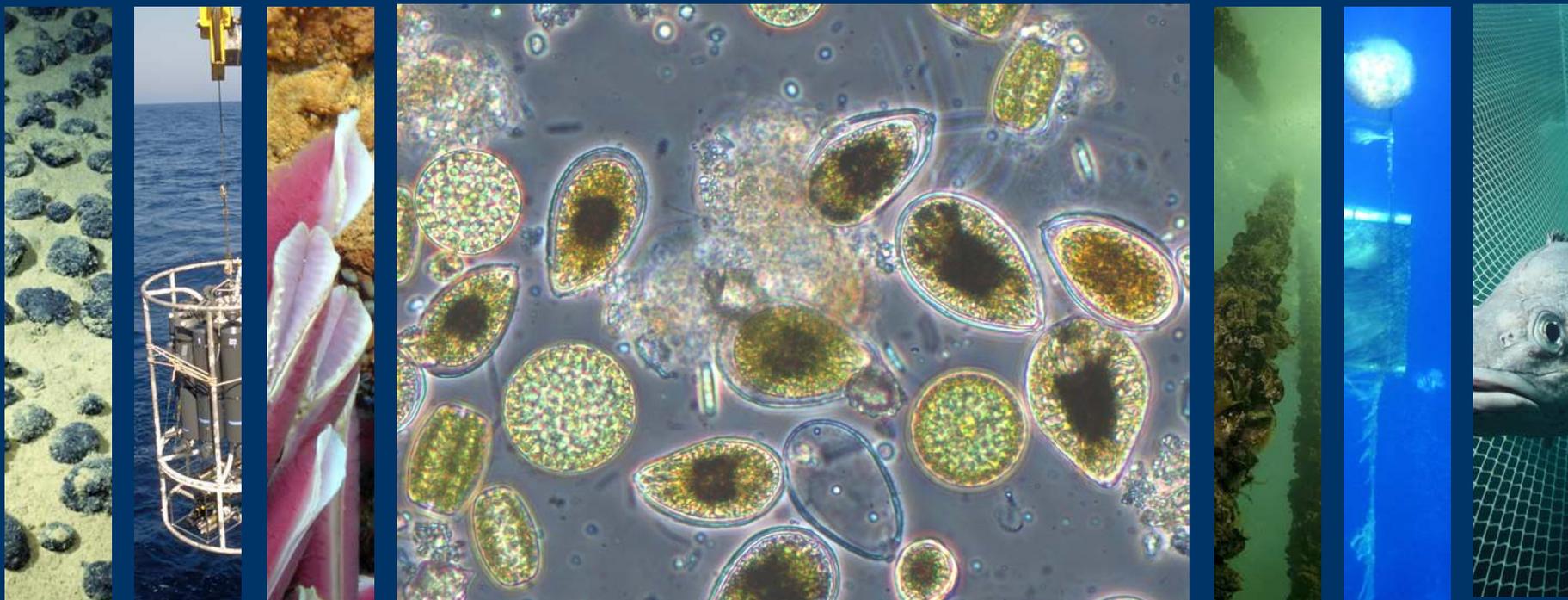
Hubert Grossel  
Ifremer, Toulon

# *Ostreopsis en Méditerranée*

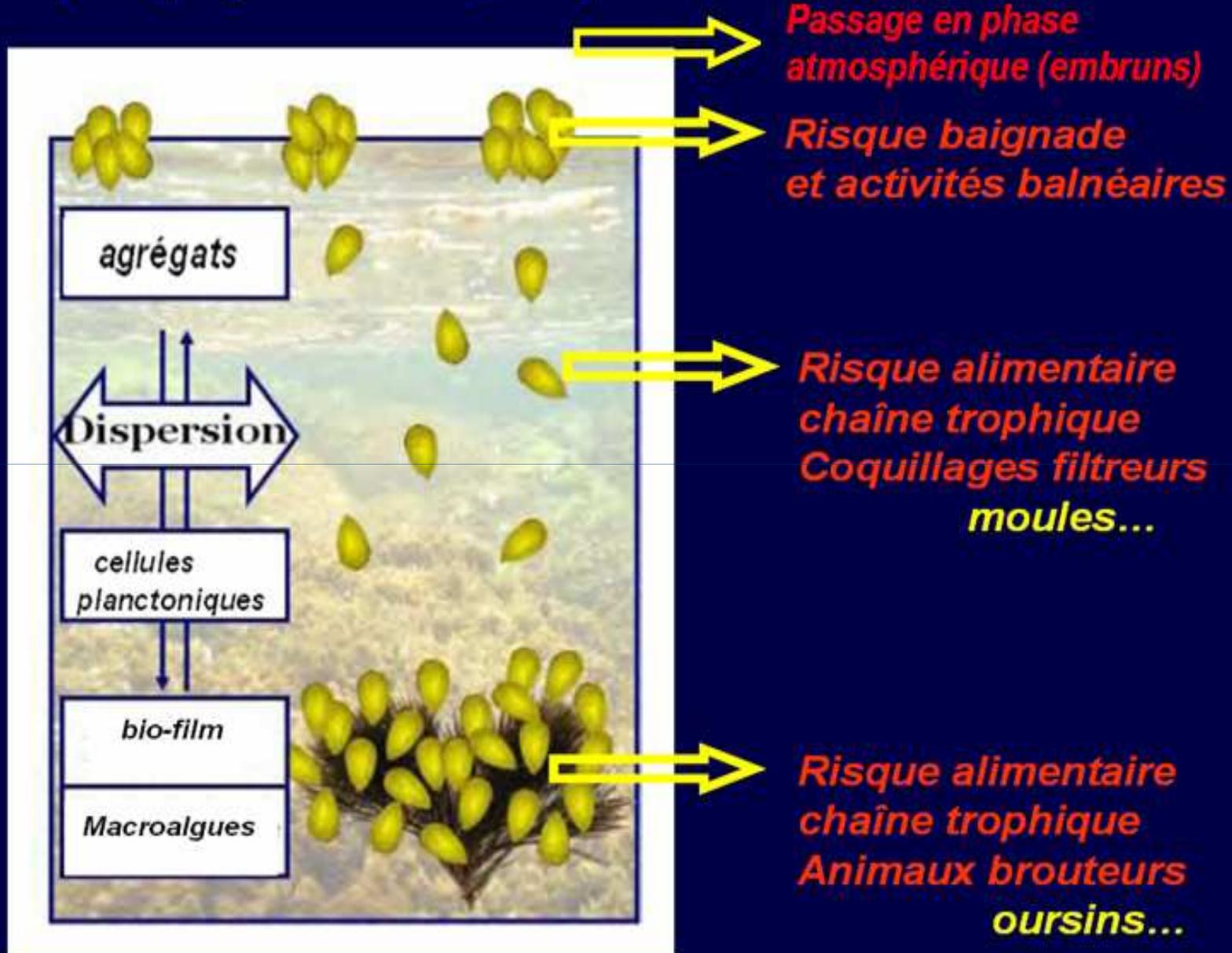
*enjeux, répartition géographique du stock macroalgal  
vers une surveillance spécifique?*

*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](mailto: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<sup>er</sup> 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.*

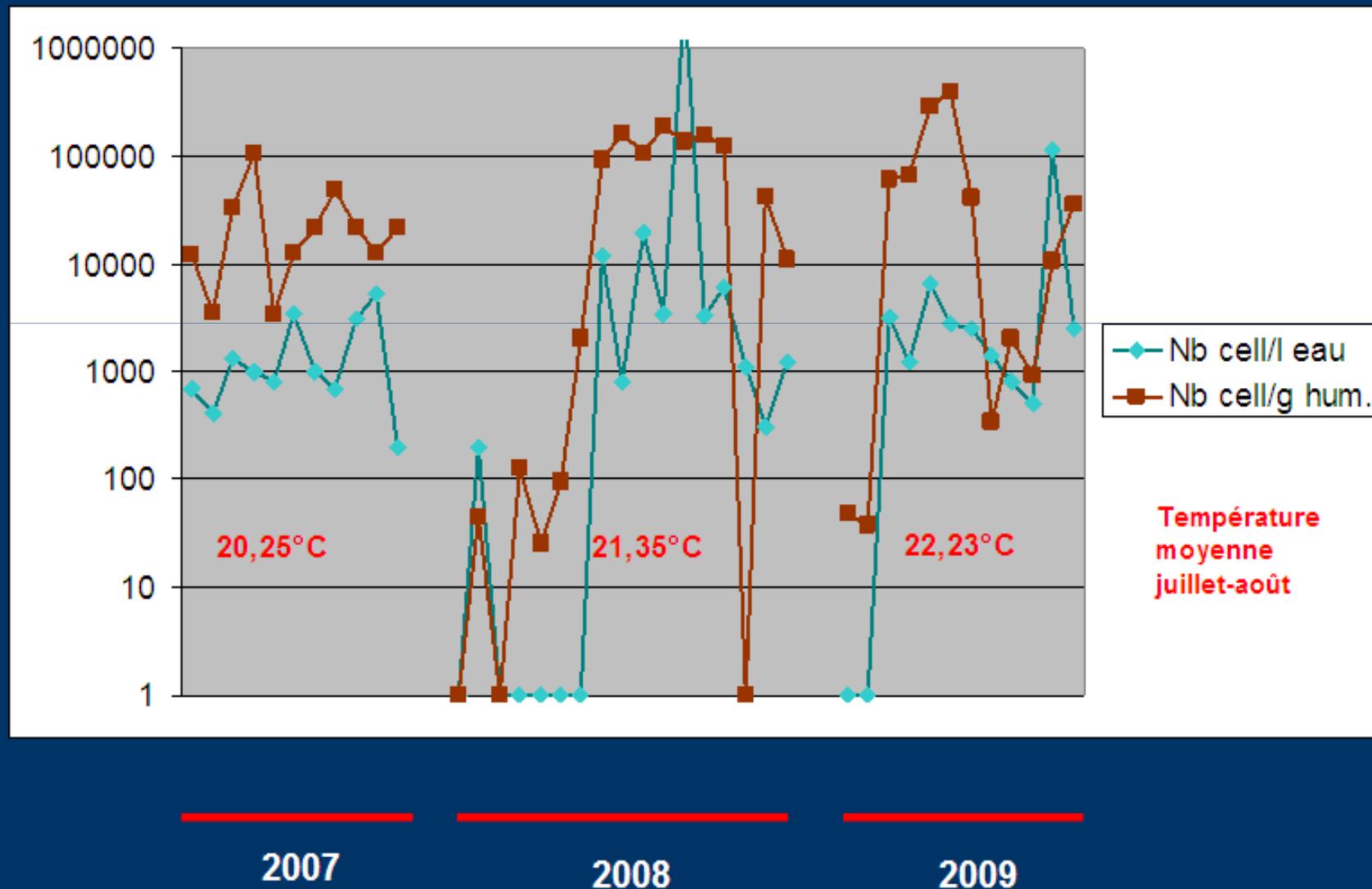
Ce projet s'est intéressé aux produits de la pêche amateur, en étroite collaboration avec l'Ifremer, le Laboratoire d'Océanographie de Villefranche et l'Agence pour la Recherche et la Valorisation Marine.

#### 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).**

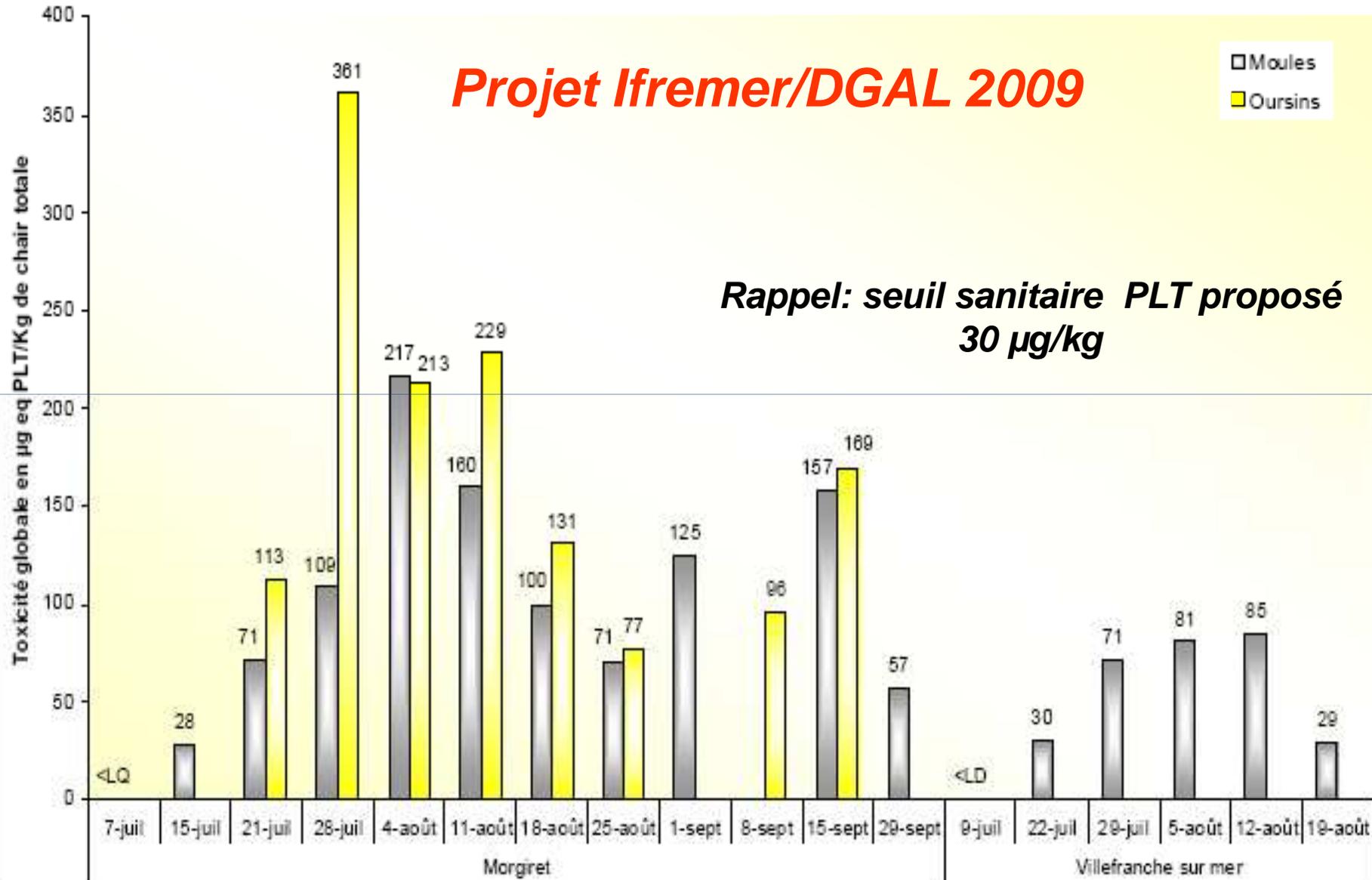


Evolution de la concentration des PLTs-like (Palytoxine et ovatoxin-a) dans les organismes marins de méditerranée au cours de l'été 2009

**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)

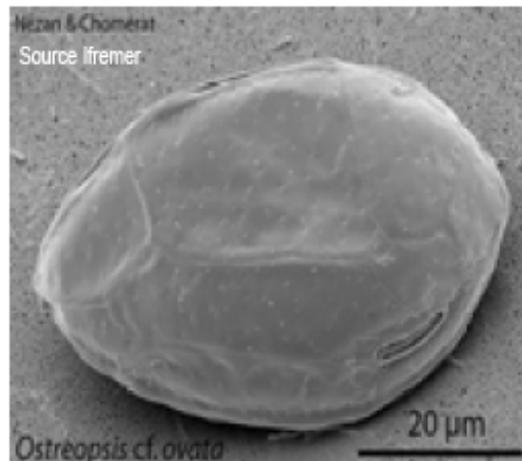
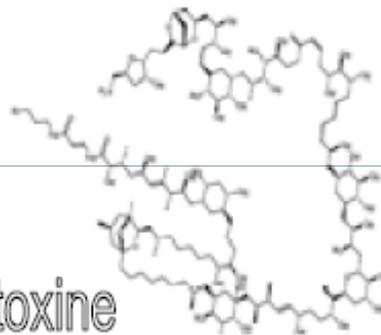
## Contexte

### *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: LARA MARCAMP

### Des symptômes ? Ostreopsis repérée ?



Source: LARA 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

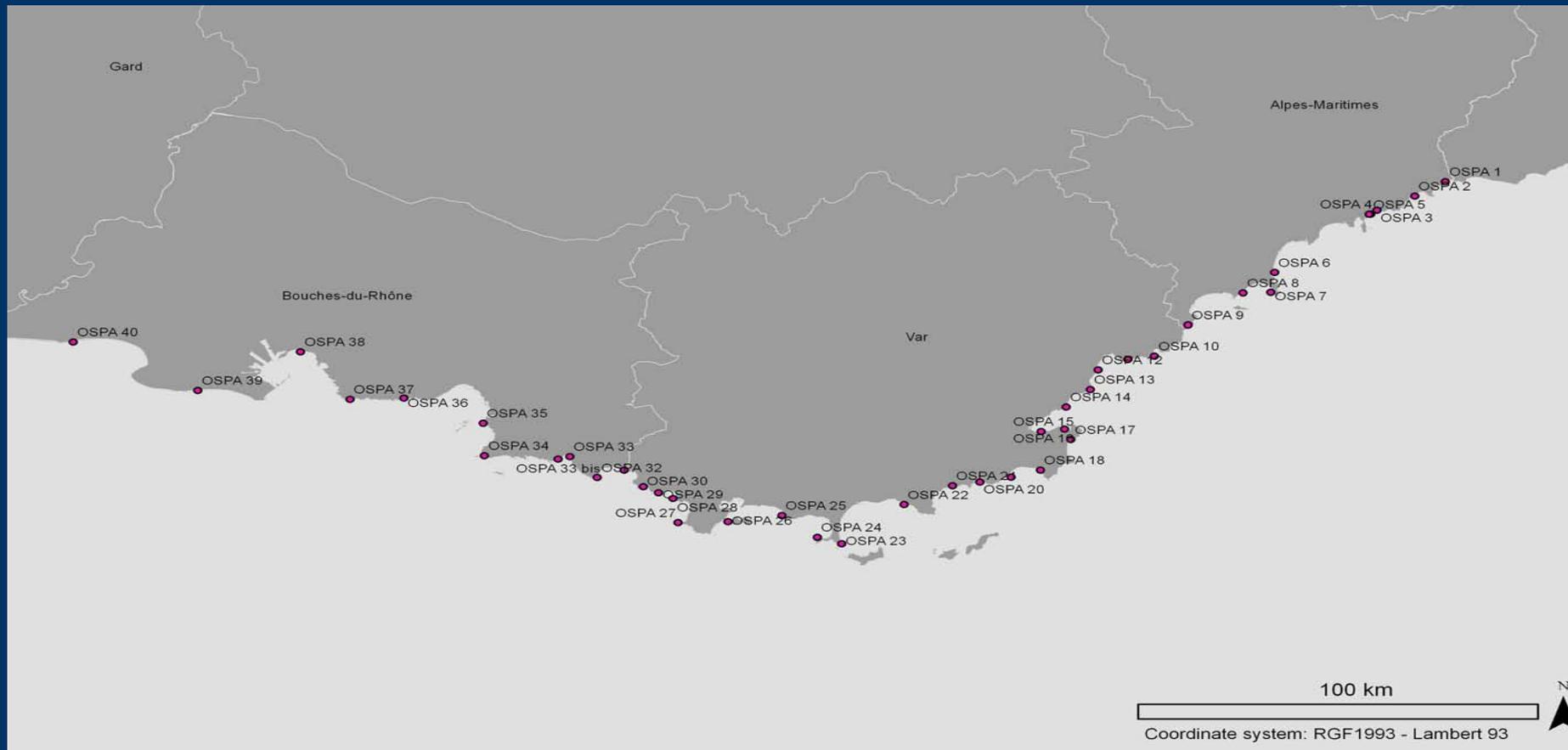
CORSE



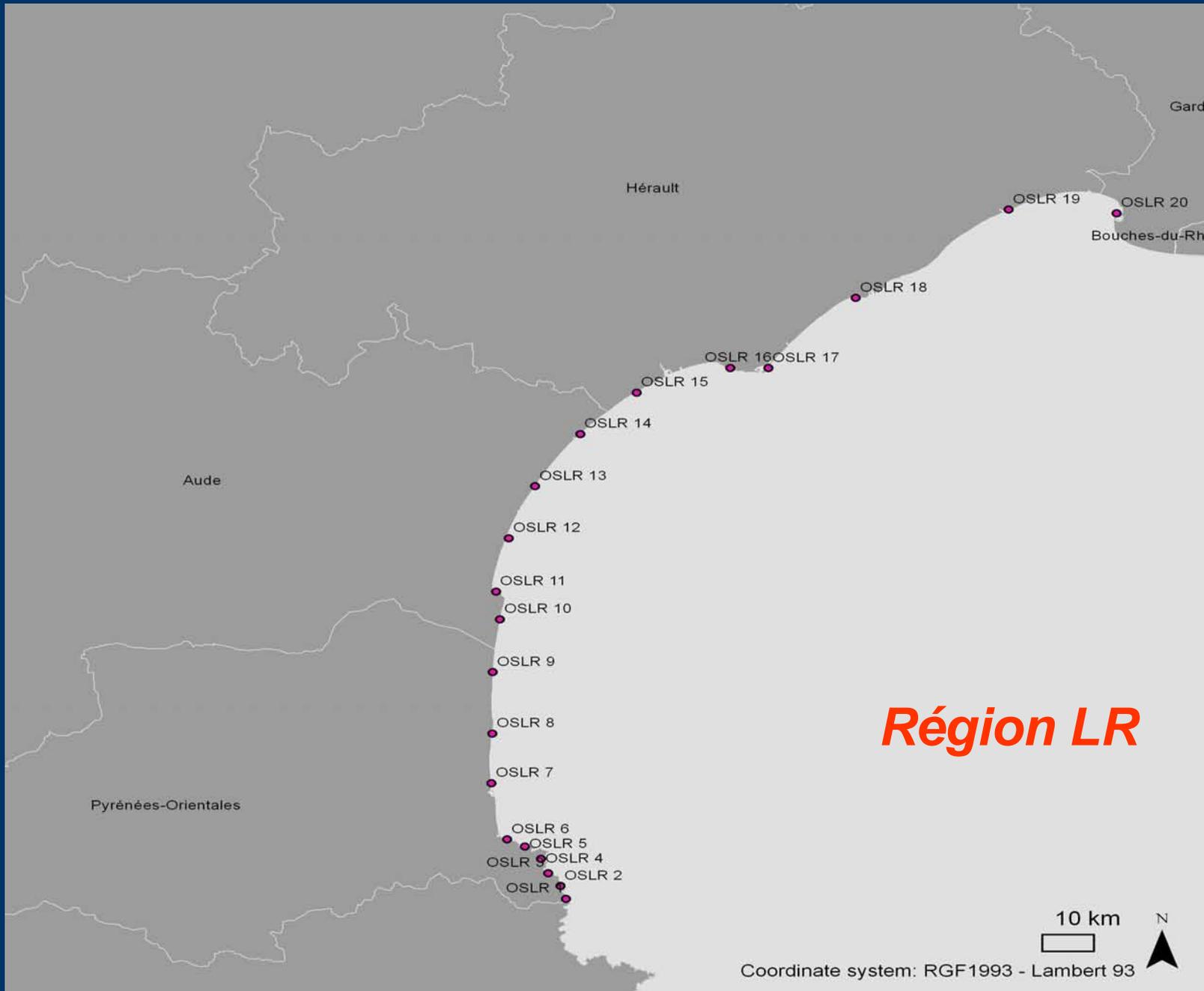
**Ifremer**  
C/To/Ler-Pac/22-06-10

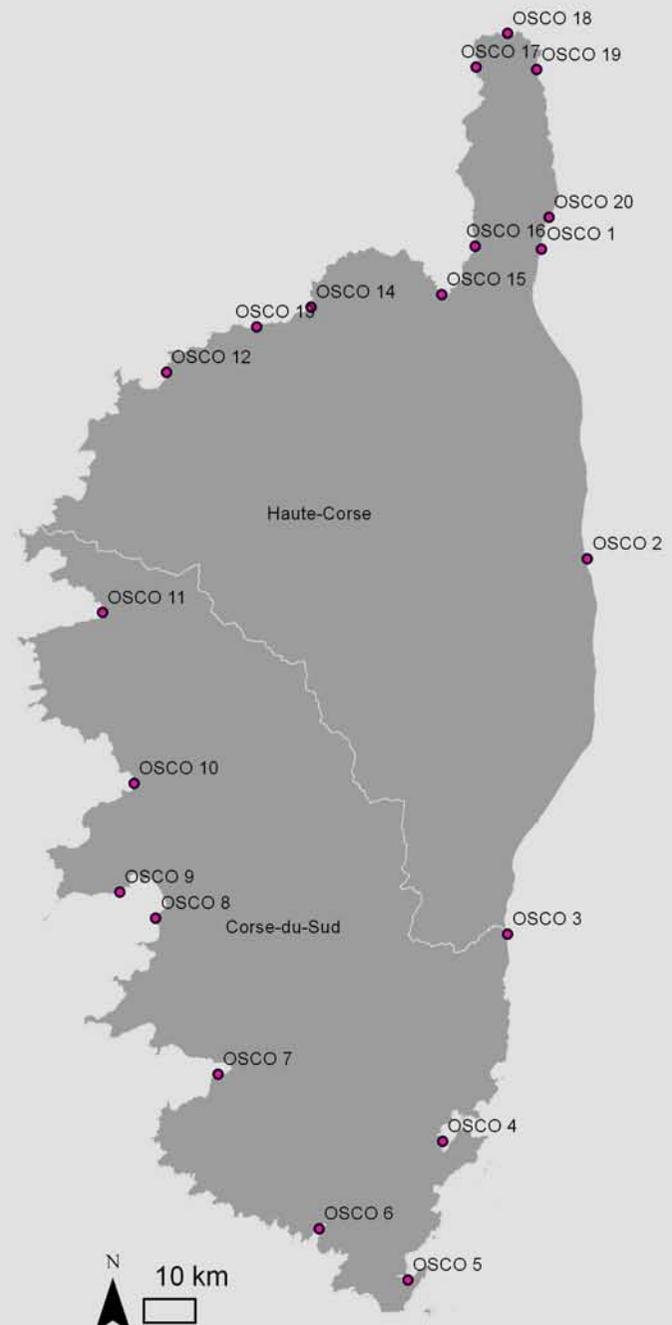


Sources: AERM&C, IGN, SHOM.



## Région PACA



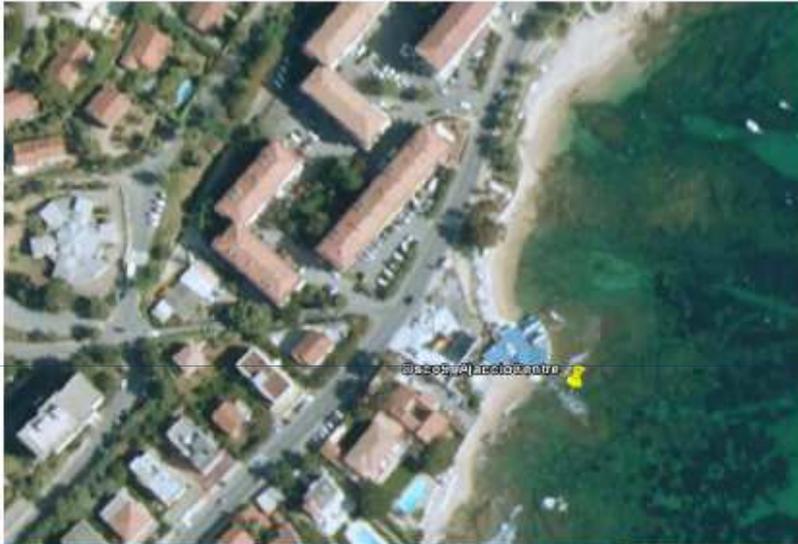


Coordinate system: RGF1993 - Lambert 93

# 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

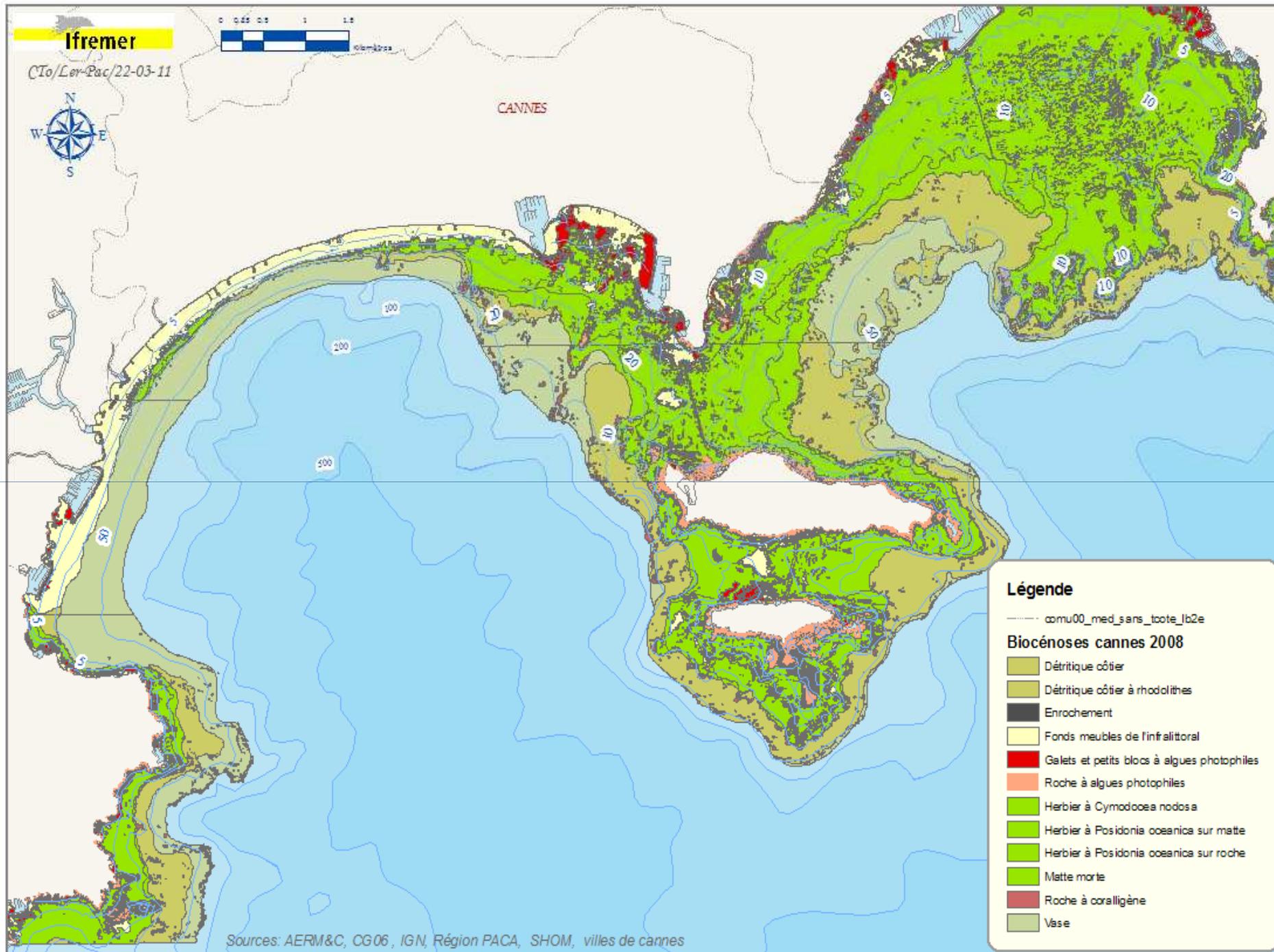
0 0.25 0.5 1 1.5



Kilomètres



CANNES



**Légende**

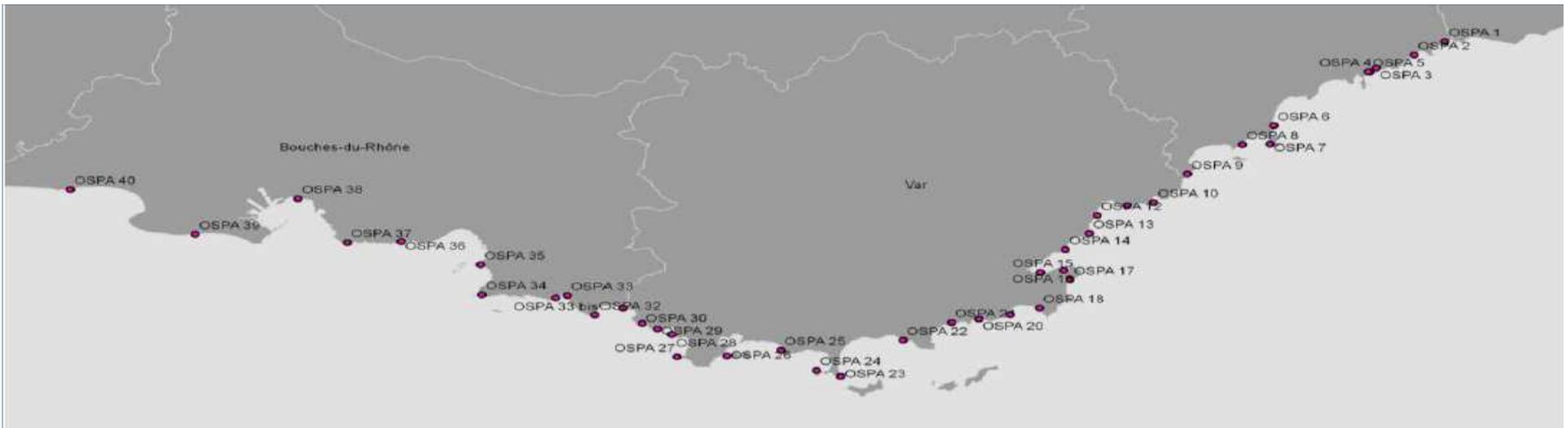
- comu00\_med\_sans\_toote\_lb2e
- Biocénoses cannes 2008**
- Détritique côtier
- Détritique côtier à rhodolithes
- Enrochement
- Fonds meubles de l'infralittoral
- Galets et petits blocs à algues photophiles
- Roche à algues photophiles
- Herbier à *Cymodocea nodosa*
- Herbier à *Posidonia oceanica* sur matte
- Herbier à *Posidonia oceanica* sur roche
- Matte morte
- Roche à coralligène
- Vase

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

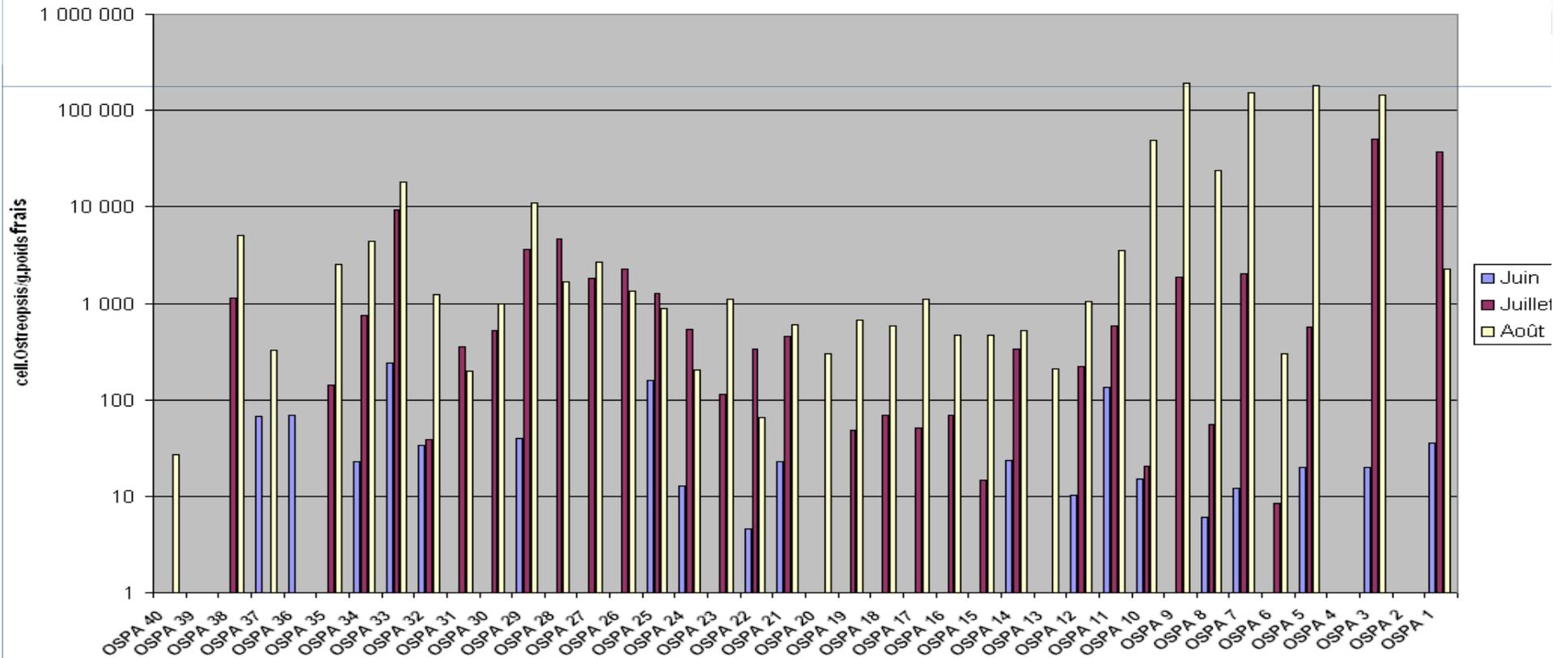
**Choix des macroalgues à échantillonner  
en tant que support de l'*Ostreopsis*:**

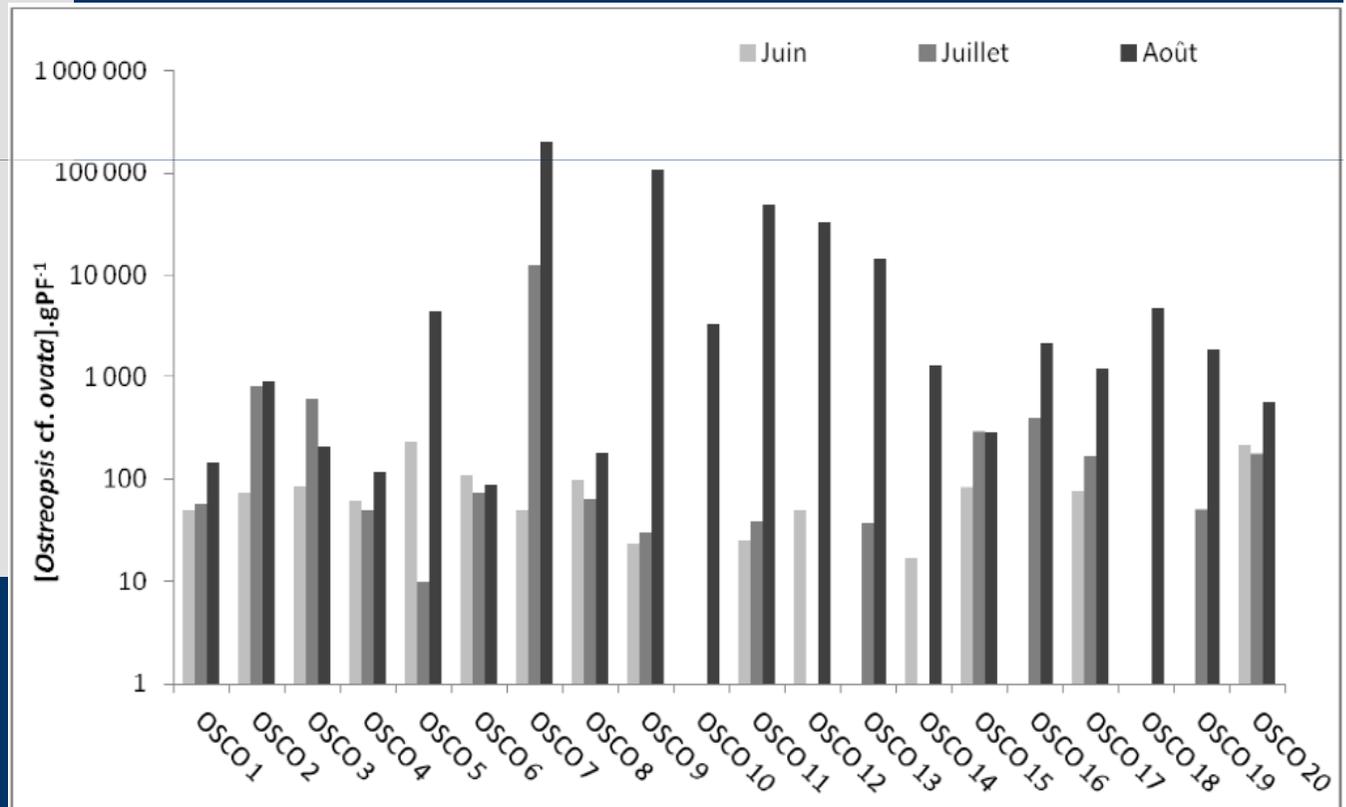
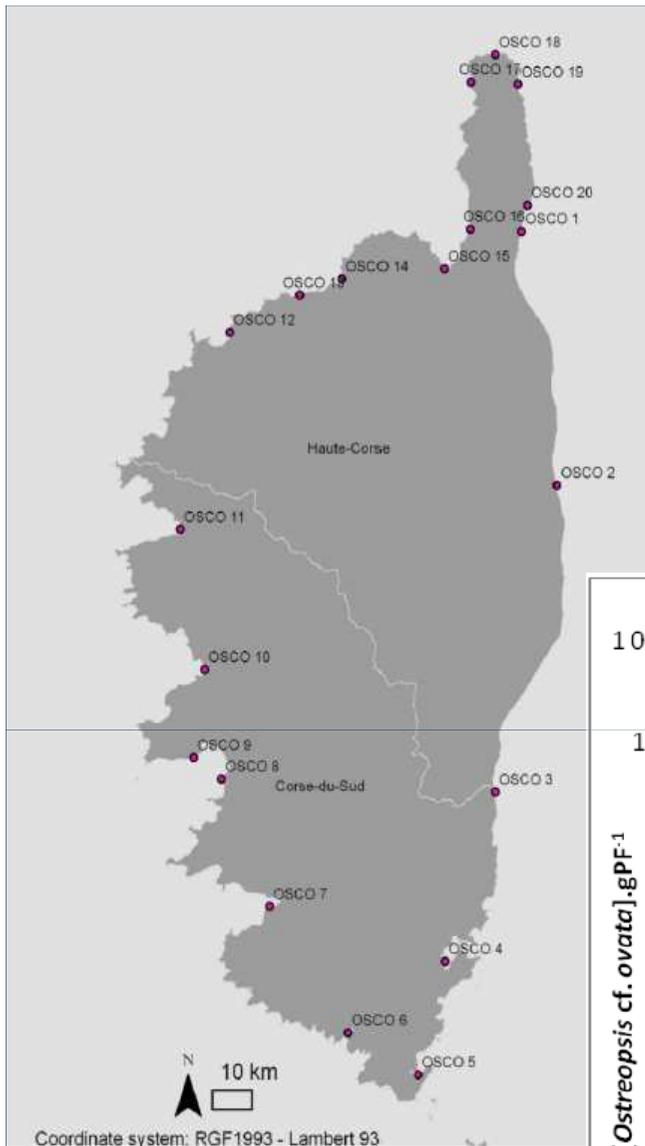
*principal problème méthodologique:  
lesquelles choisir ?*

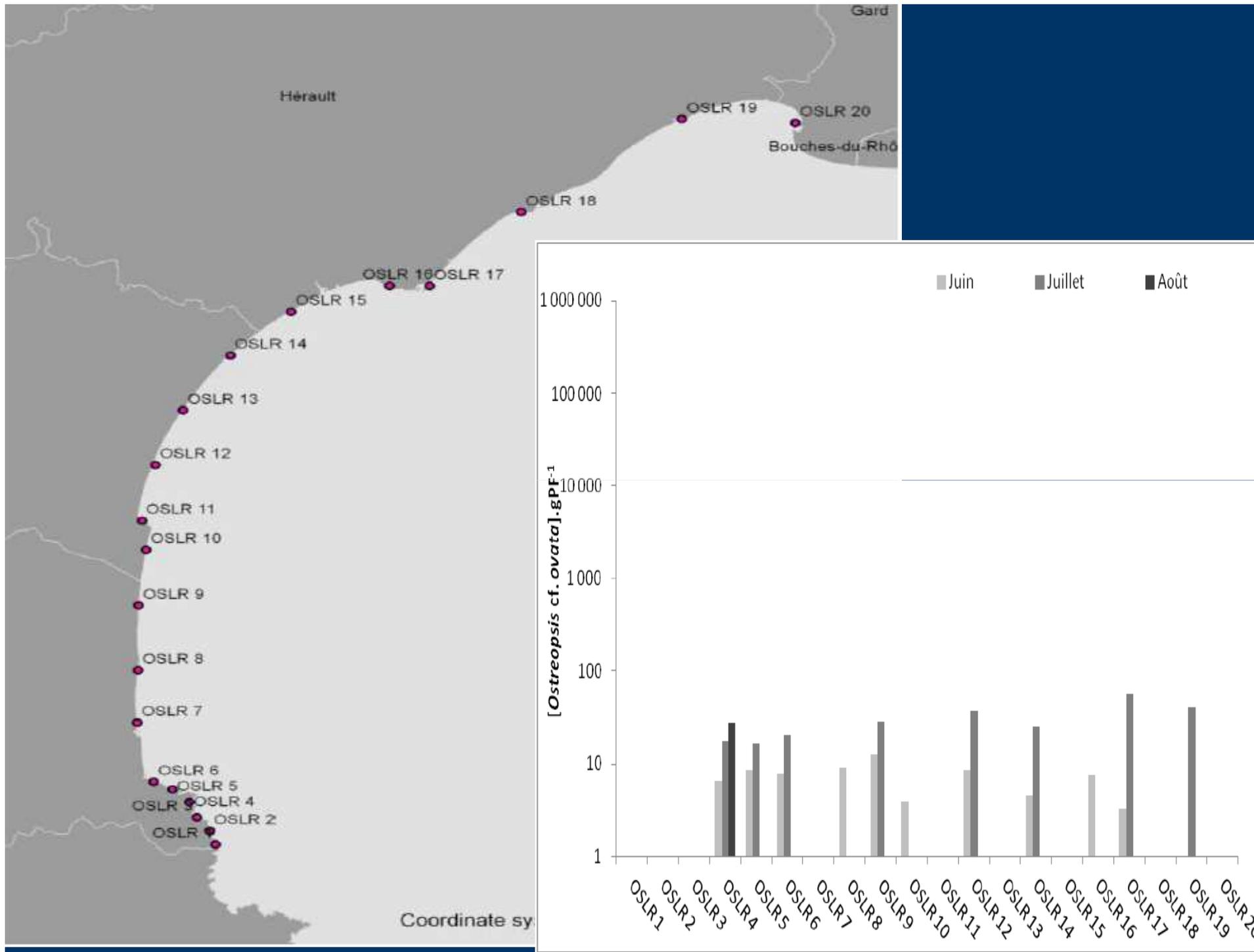




### Ostreopsis macro-algal en région PACA

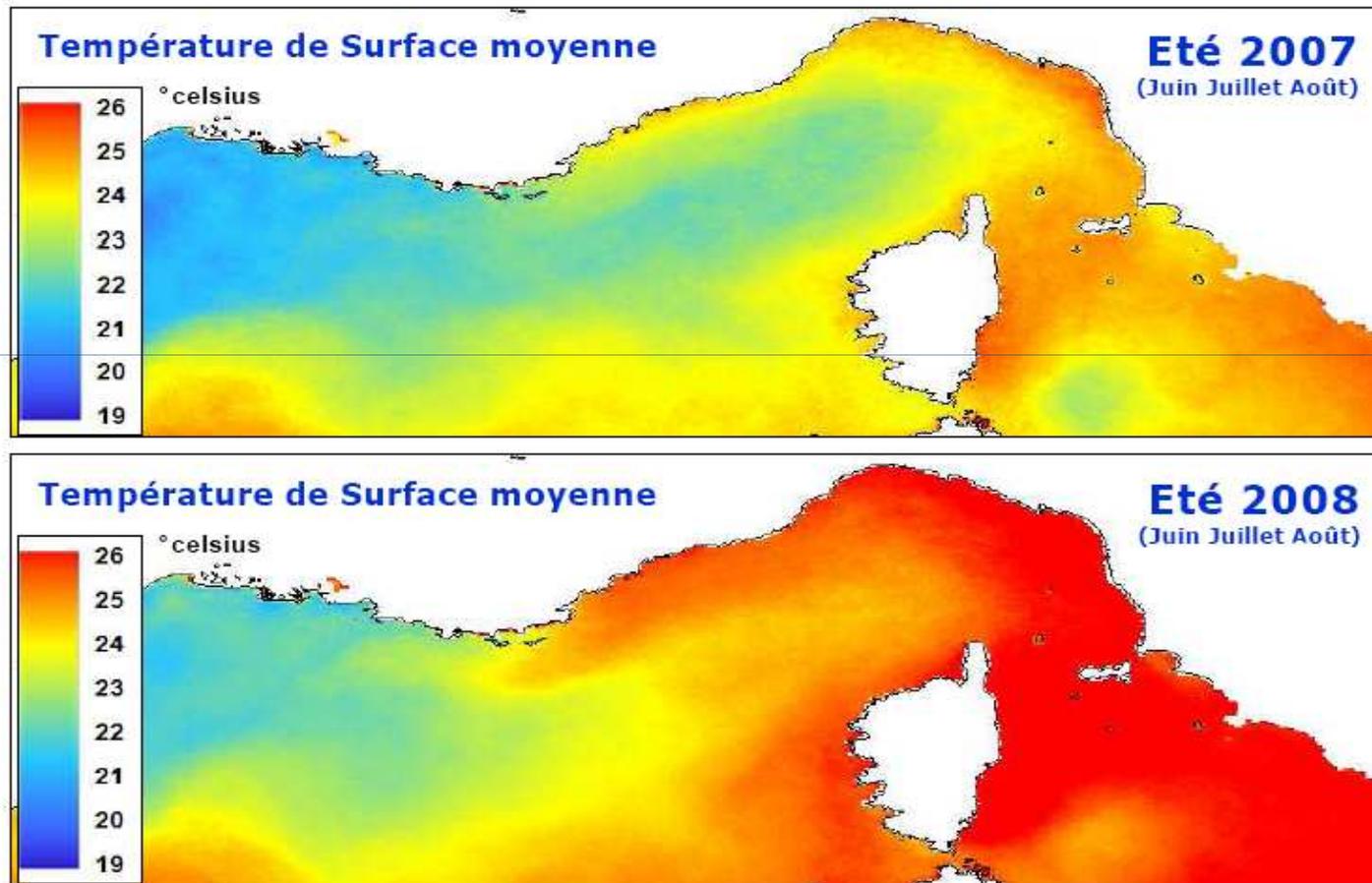




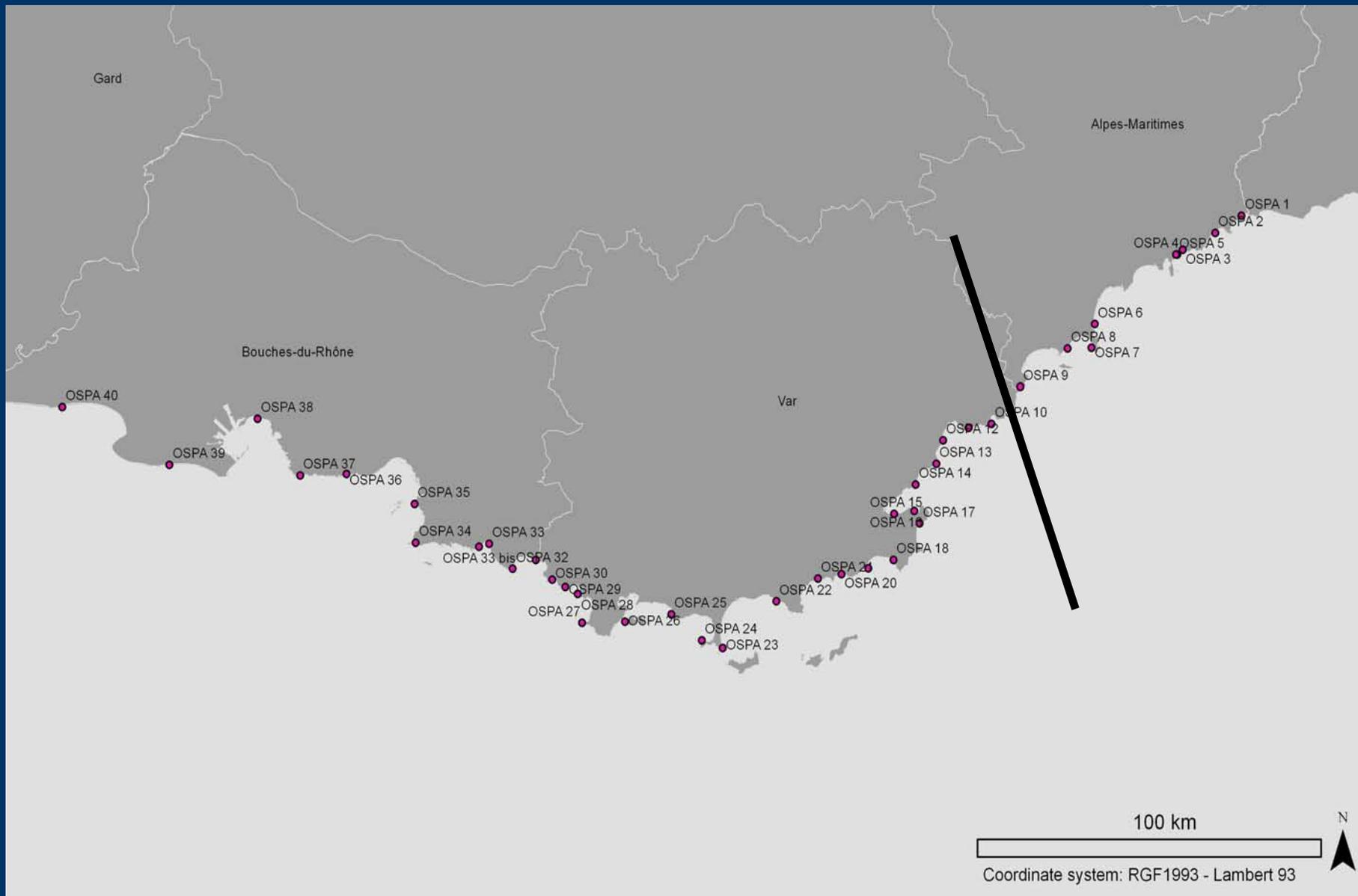


**Cette étude suggère que les sites ayant une forte couverture algale composée de *Halopteris scoparia*, *Jania rubens* et *Laurencia obtusa* sont plus susceptibles de supporter des développements massifs d'Ostreopsis.**

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

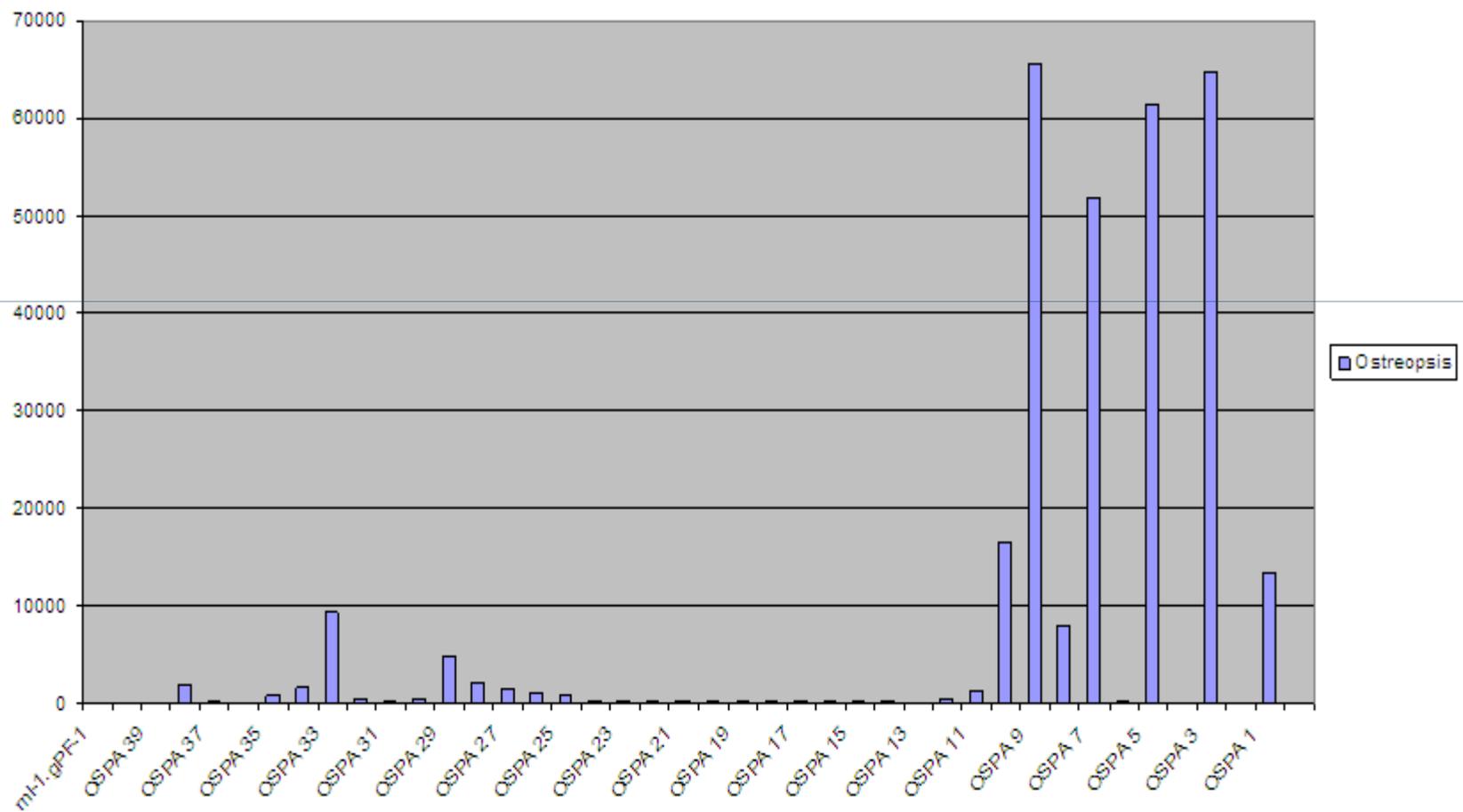


*Images moyennes saisonnières de température de surface (moyenne des SST satellites pour les mois de juillet, août et septembre) pour les années 2007 et 2008*



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

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

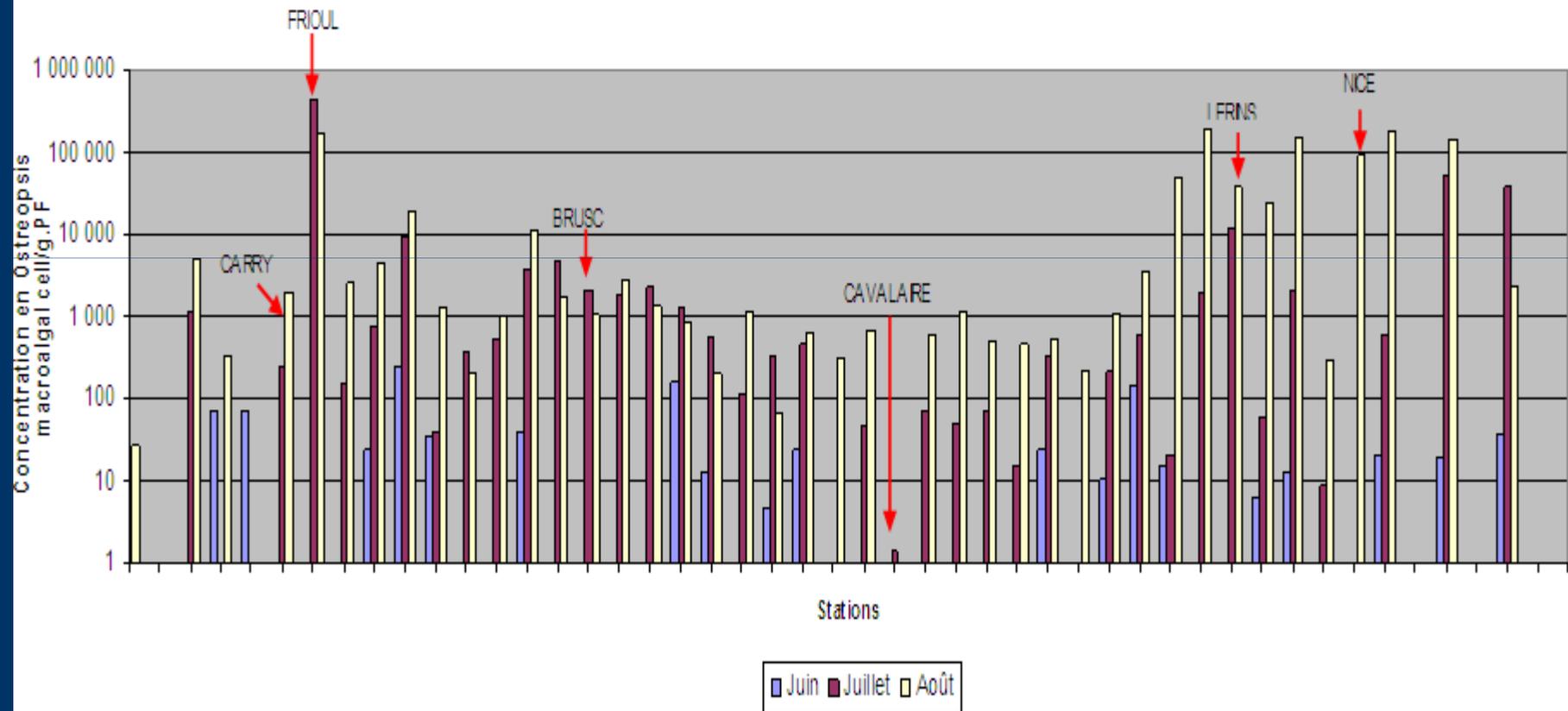


## Les stations du volet 2

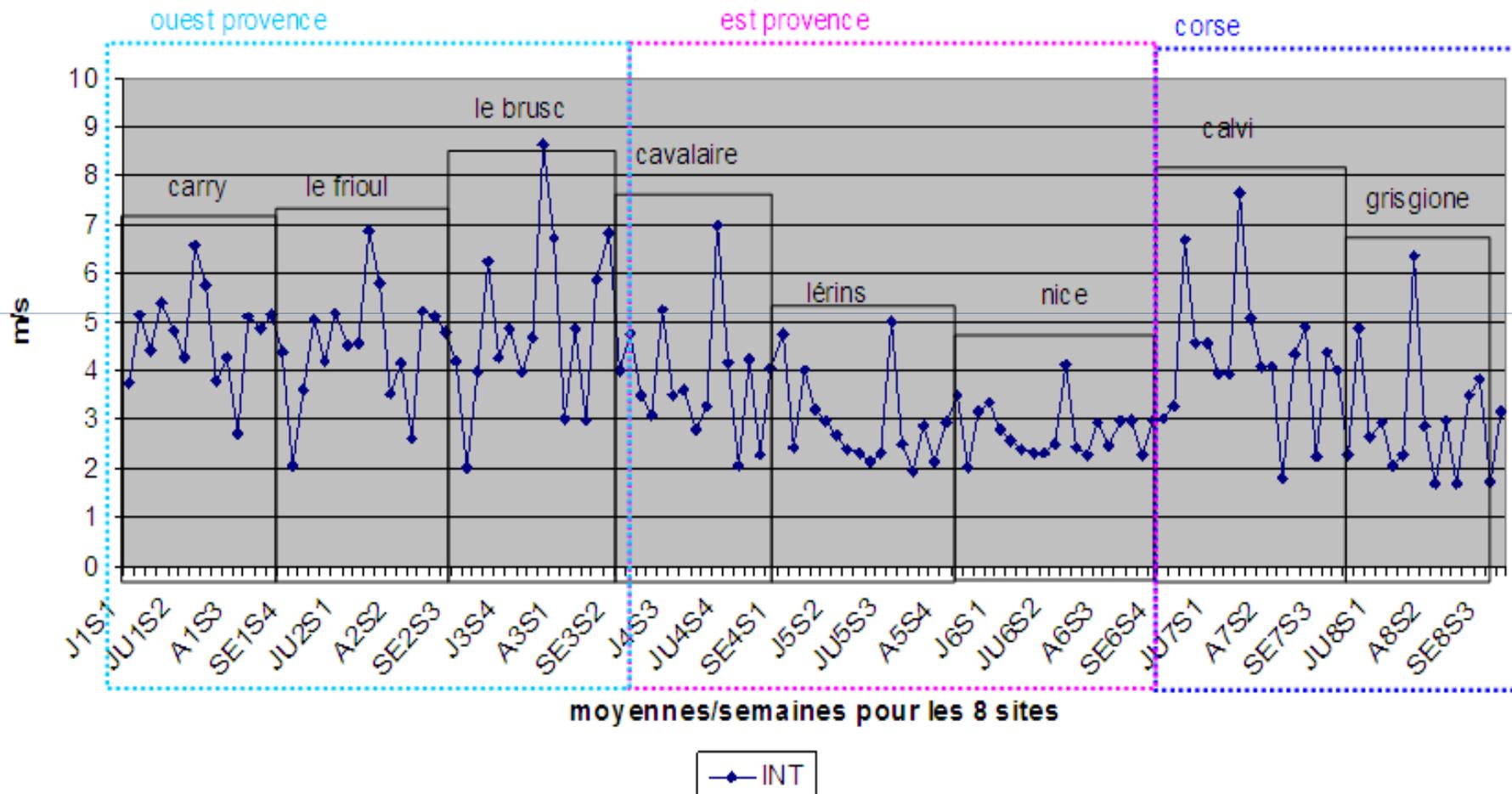


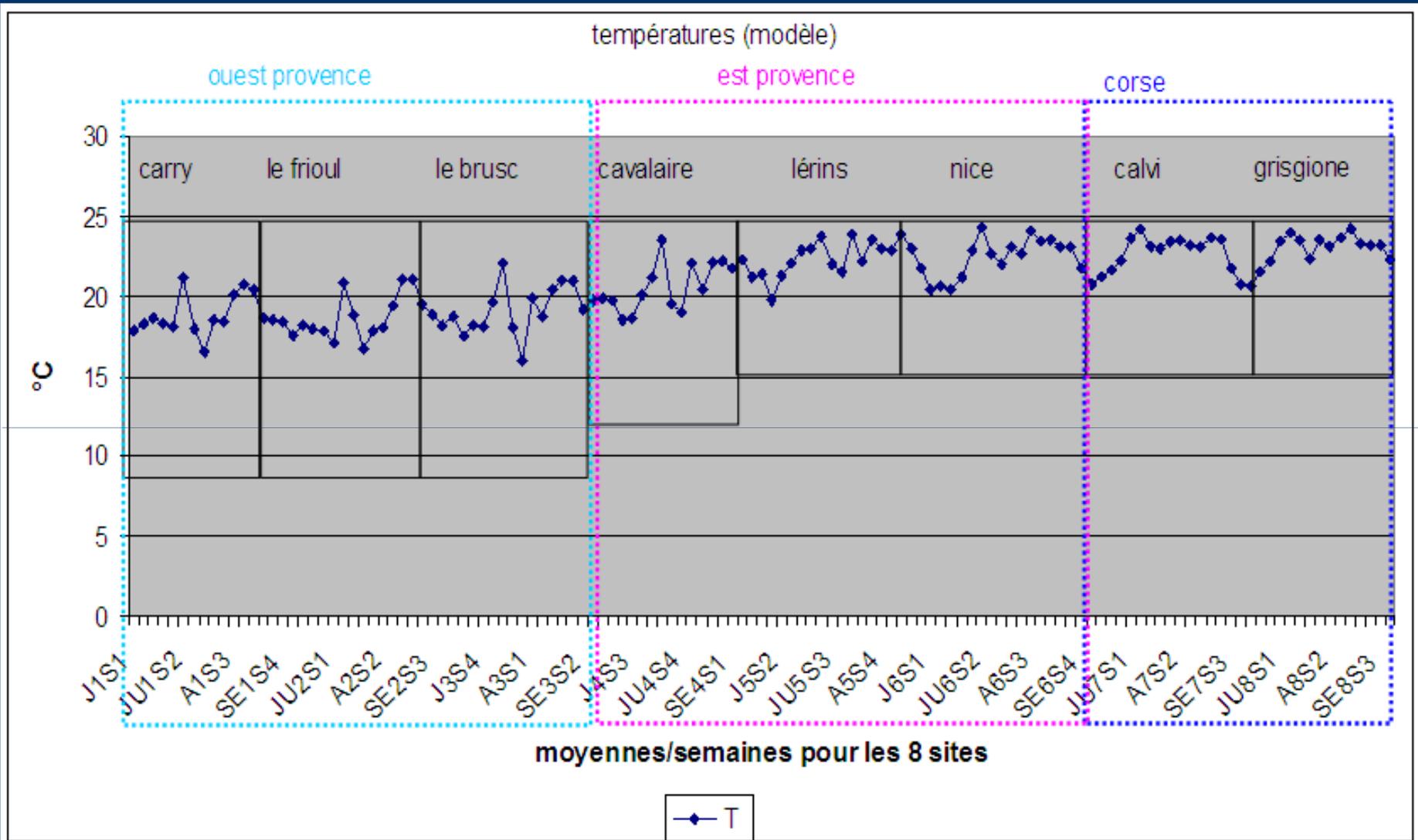


## Evolution spatio-temporelle de l'Ostreopsis macroalgal: insertion des stations du volet 2 dans le volet 1 PACA

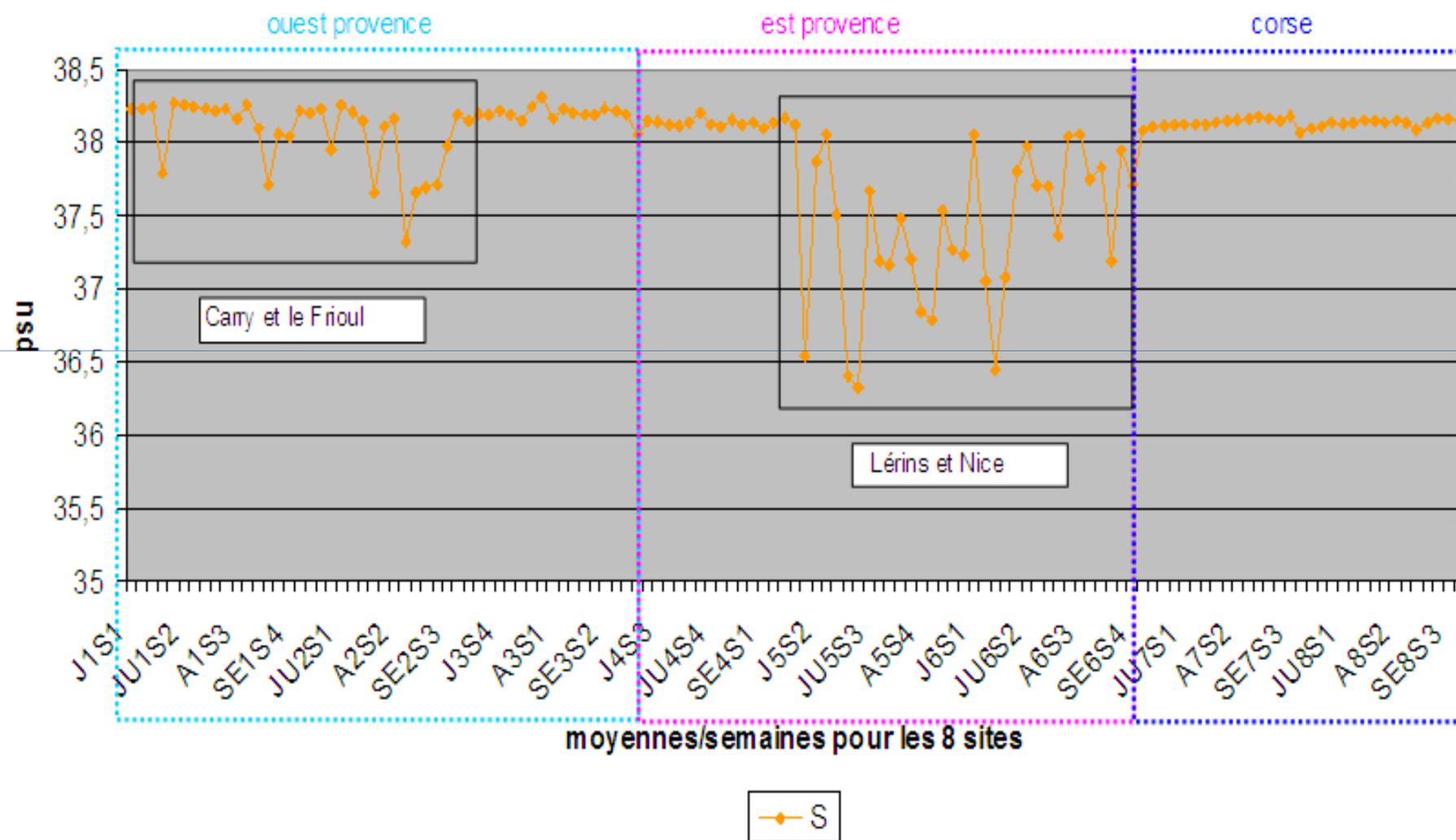


intensité vents (modèle)

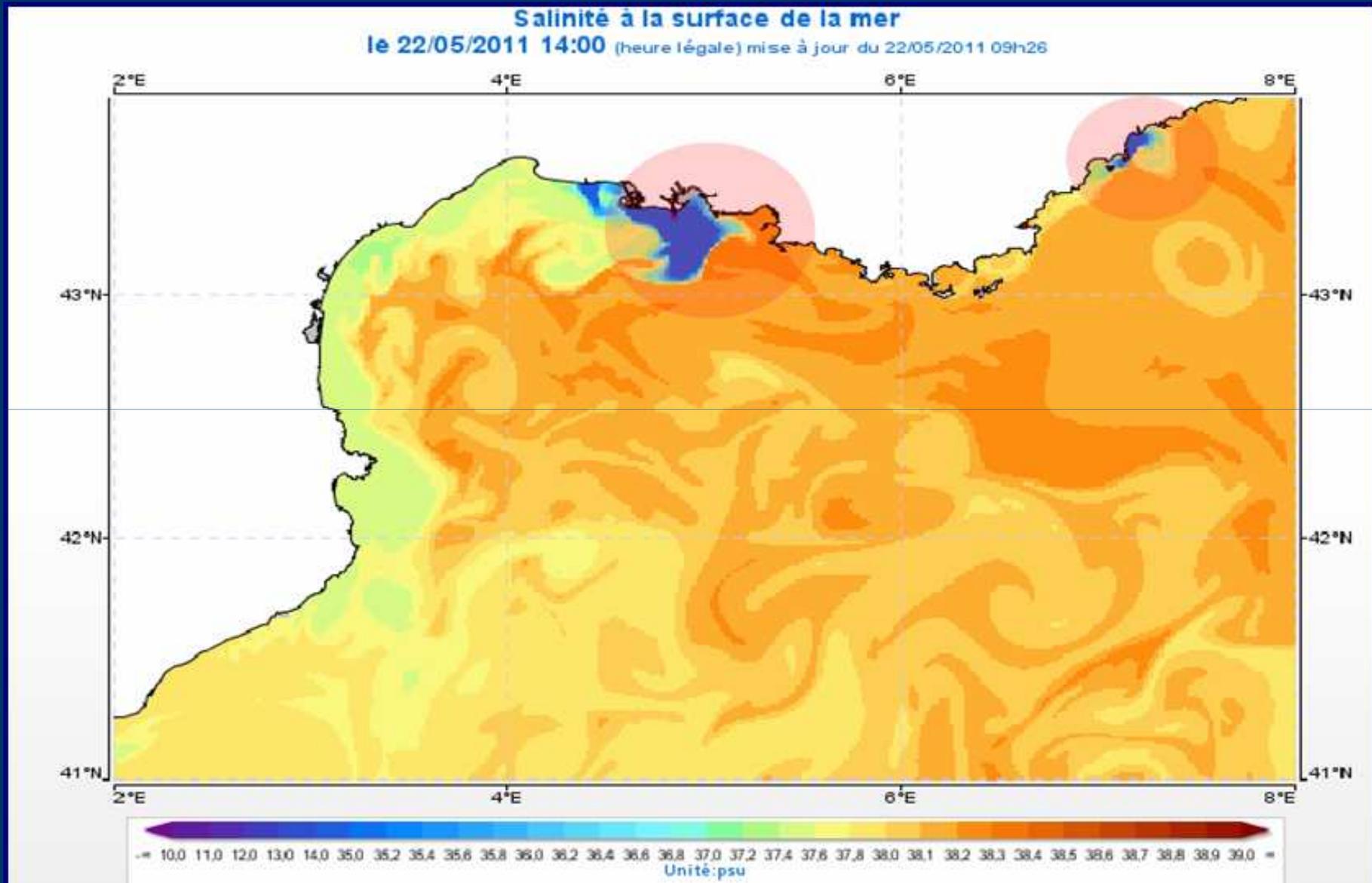




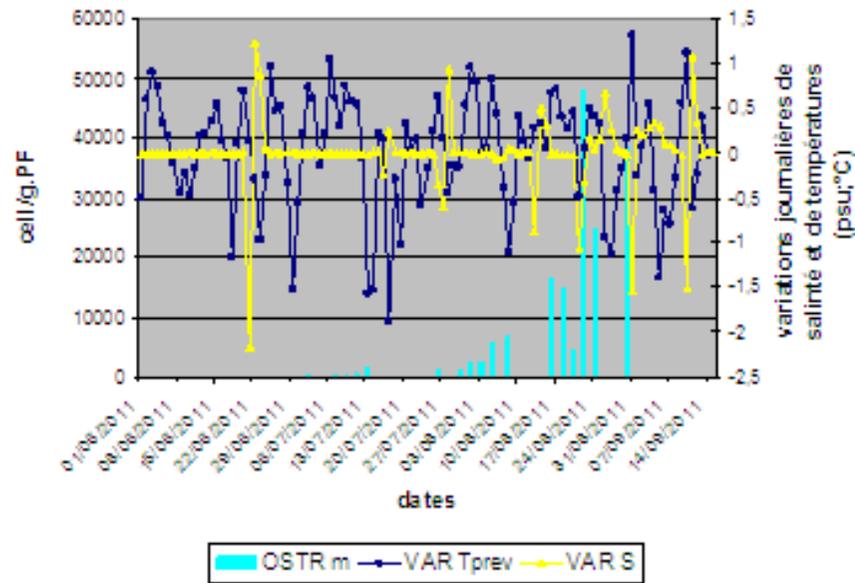
### Salinité (modèle)



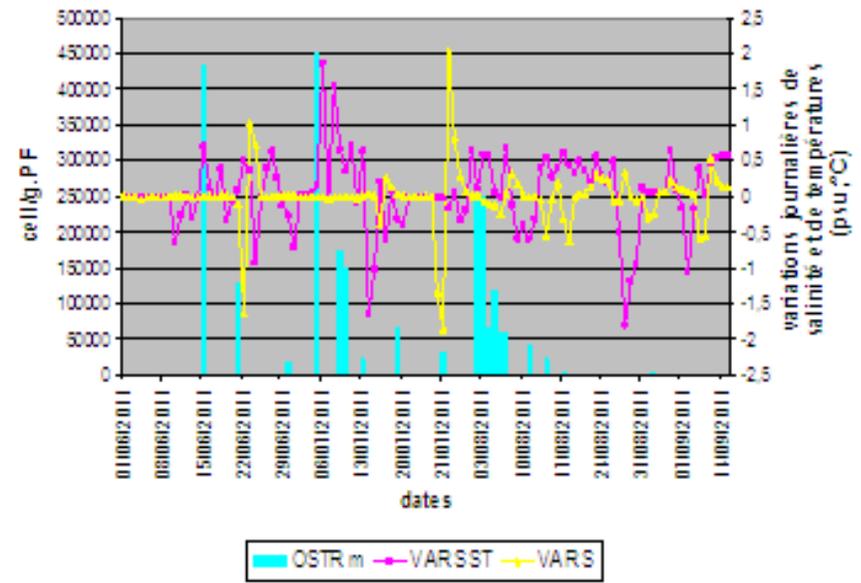
## Exemple de représentation des variations de salinité issue du modèle



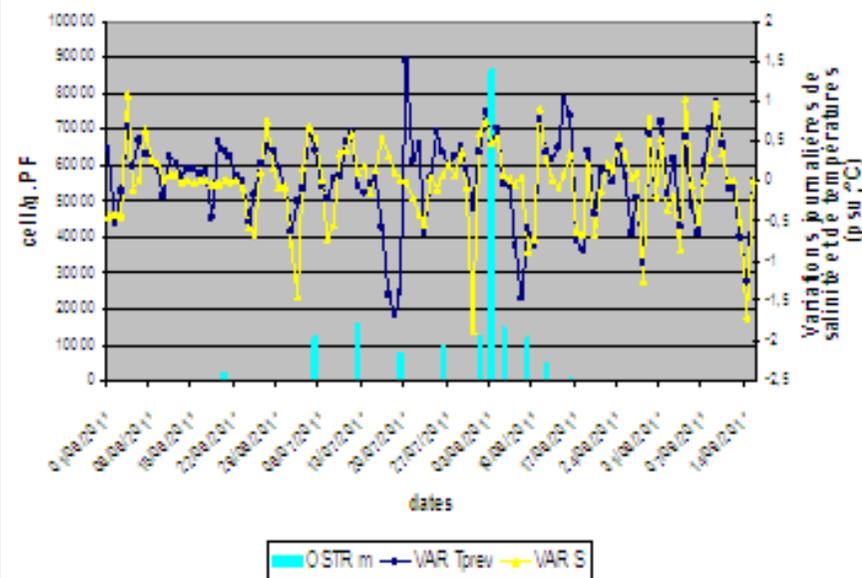
### CARRY



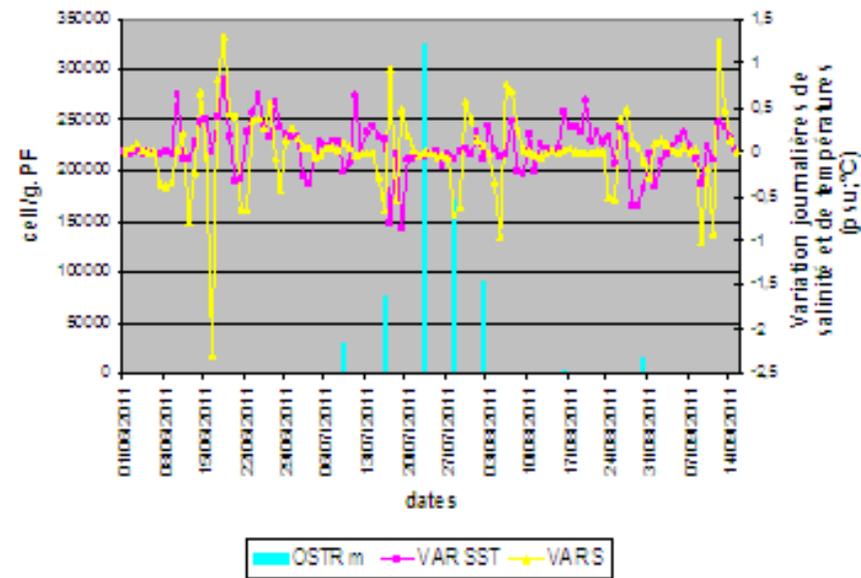
### FRIUL



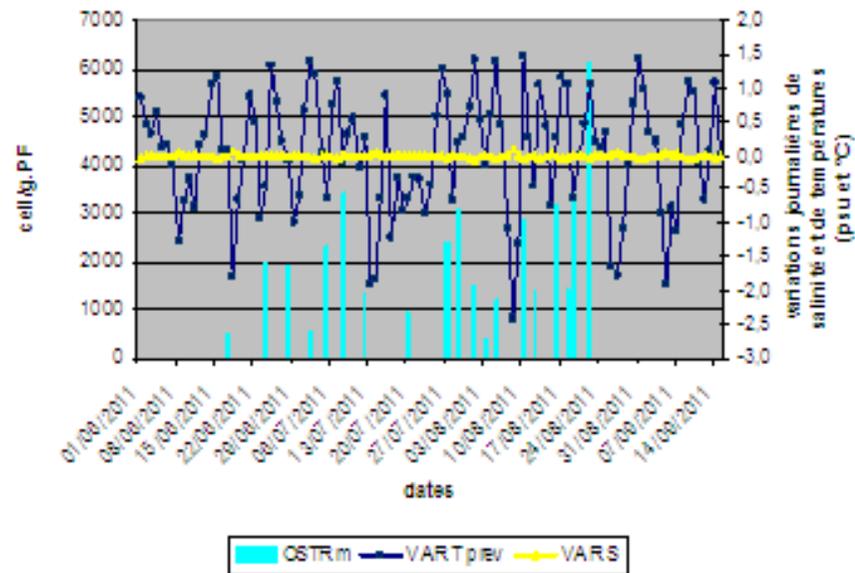
### LERINS



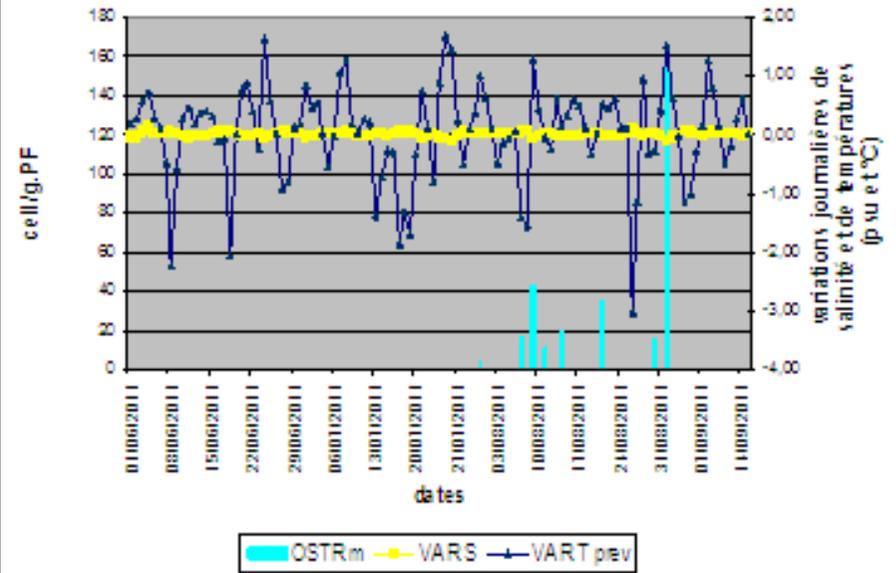
### NICE



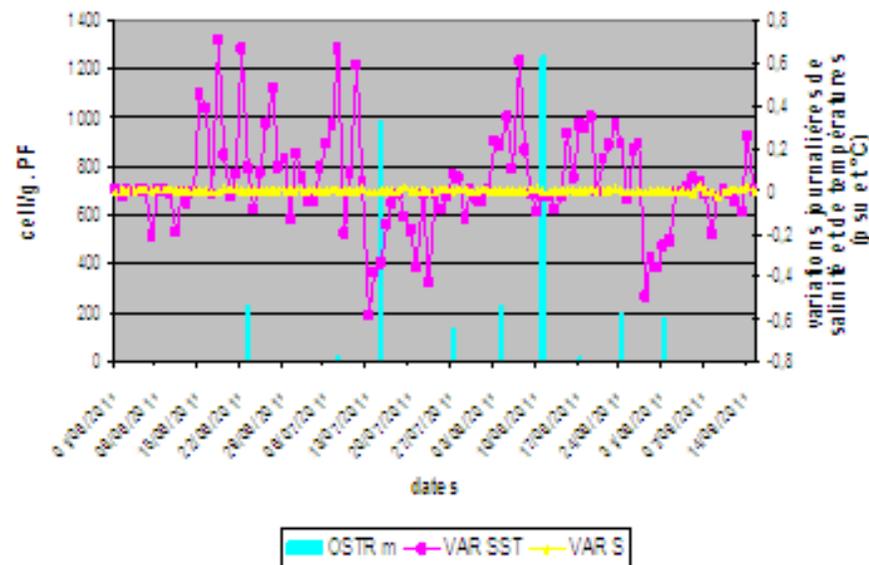
LE BRU SC



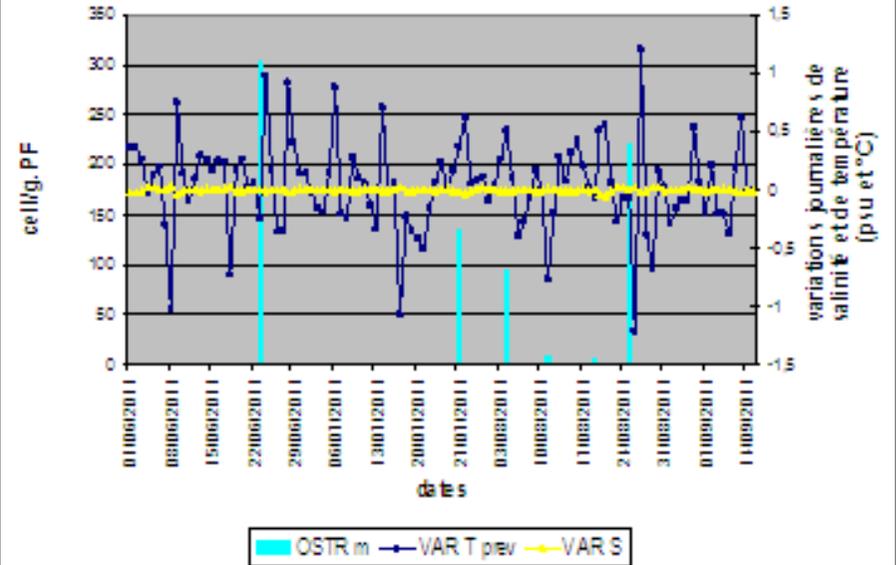
CAVALAIRE



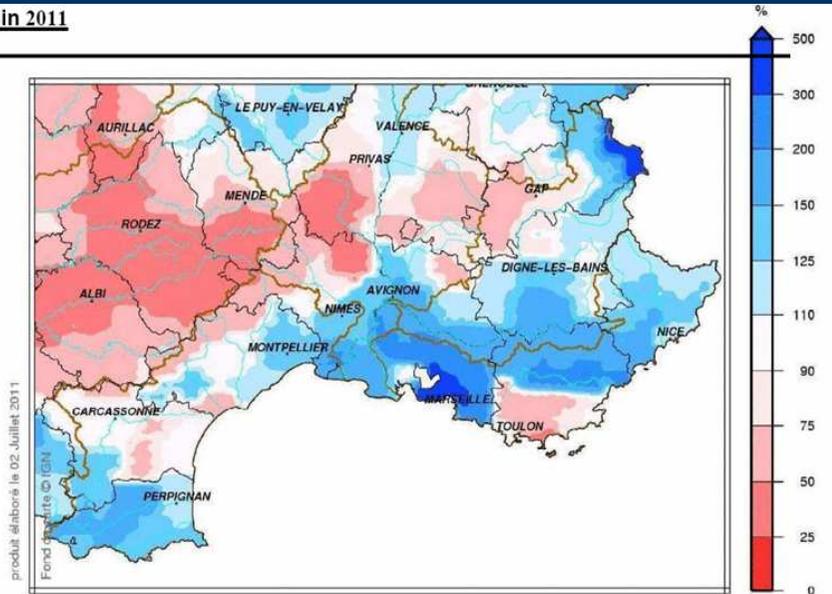
CALVI



GRI SGIONE

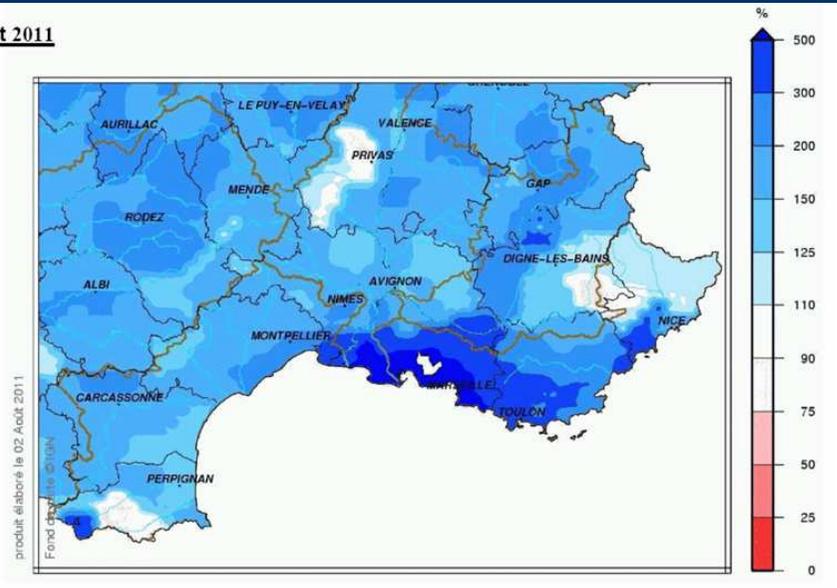


**Jun 2011**



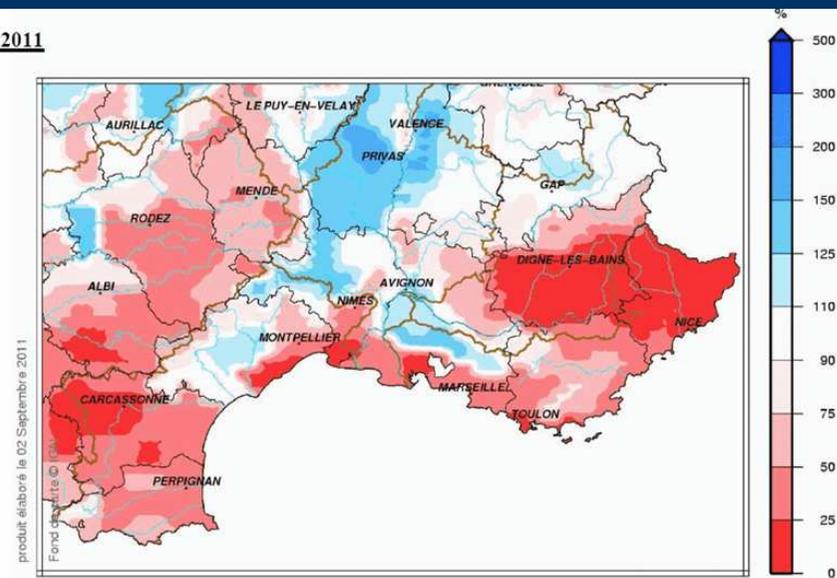
Source METEO France

**Juillet 2011**



Source METEO France

**Août 2011**



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<sup>er</sup> 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

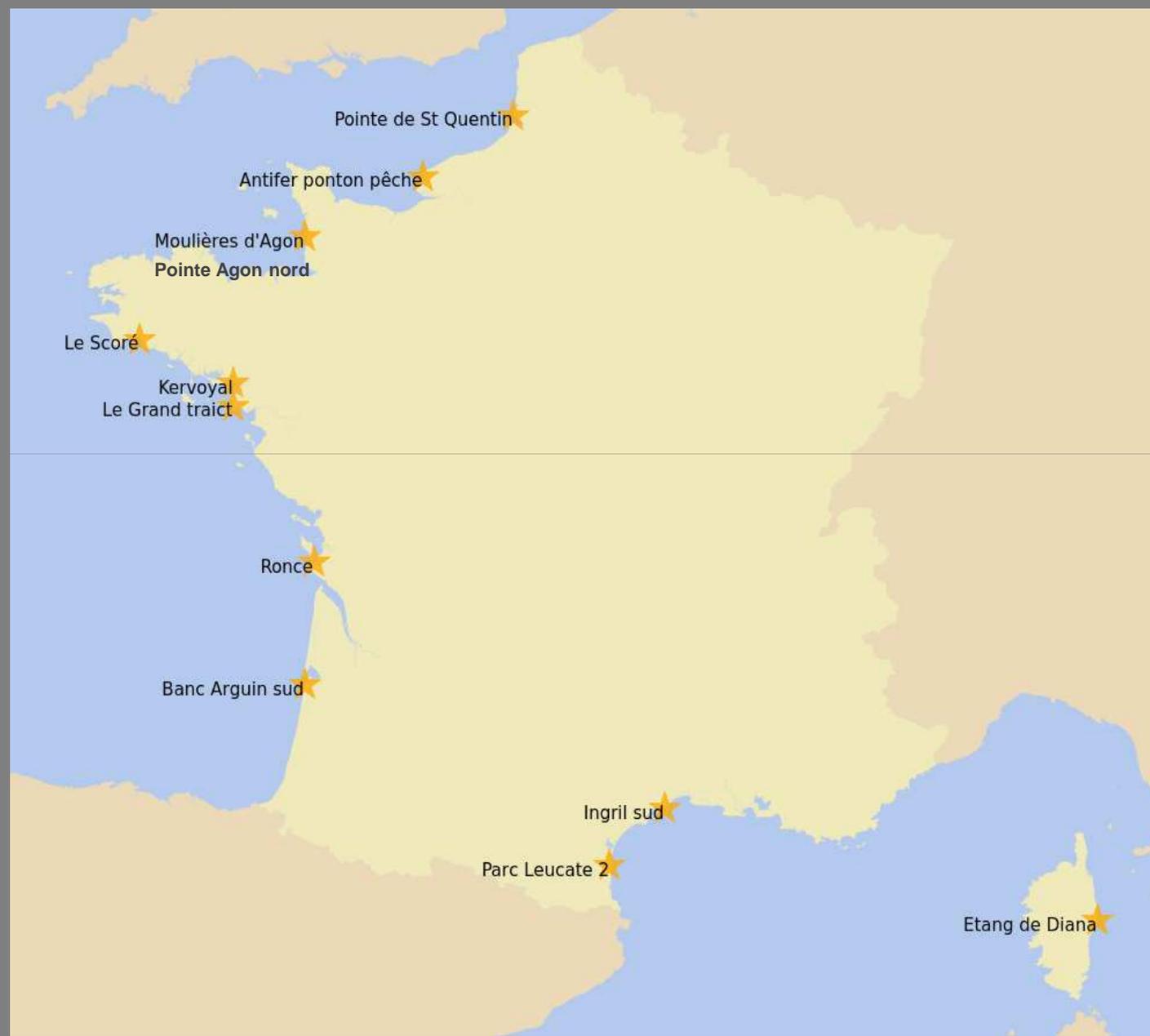
## 7 Lieux choisis pour avoir connu des discordances (BE+, AC-)



## Autres Lieux choisis

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

# 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<sub>sa</sub>, PTX2<sub>sa</sub> épimère, PTX6)

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

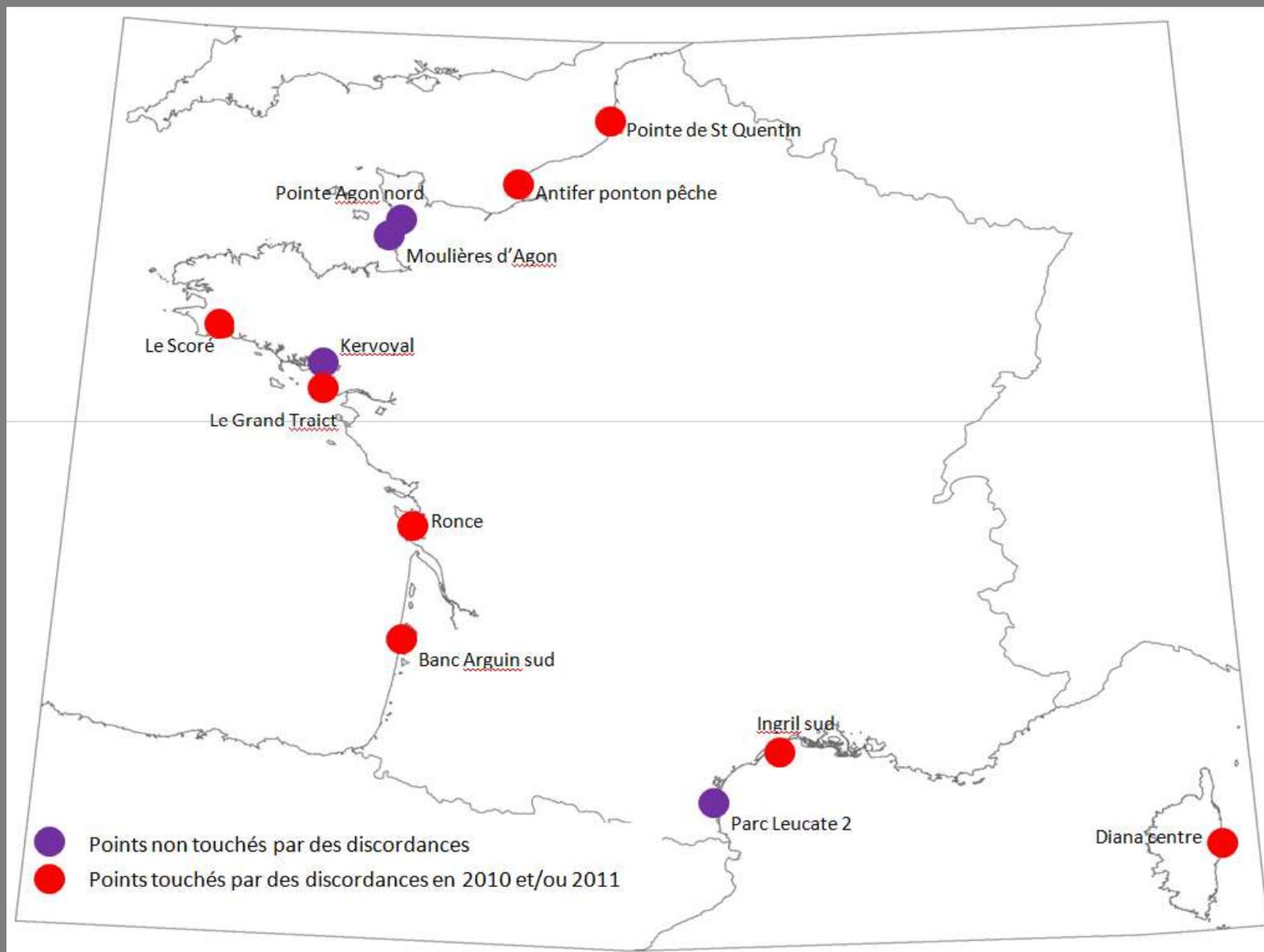
# Bilan 2010

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	
<b>Totaux</b>		<b>134</b>	<b>117</b>	<b>10</b>	<b>7</b>	<b>0</b>

# 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			
<b>Totaux</b>		<b>153</b>	<b>123</b>	<b>7</b>	<b>23</b>	

# 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	
<b>Le Grand traict</b>	<i>Moules</i>	17/05/2010	850	87	n	n	n
<b>Banc Arguin sud</b>	<i>Huîtres</i>	<b>17/05/2010</b>	877	<b>137</b>	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
<b>Diana centre</b>	<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>	<b>25/10/2011</b>	1226	<b>145</b>	n	n	n
Le Scoré	<i>Moules</i>	<b>04/07/2011</b>	881	<b>140</b>	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>	<b>03/05/2011</b>	1020	<b>128</b>	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>	<b>06/06/2011</b>	874	<b>115</b>	n	<b>120</b>	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 Hess<sup>1</sup>

V. Séchet<sup>1</sup>, E. LeRoy<sup>1</sup>, F. Vanel<sup>1</sup>, F. Hervé<sup>1</sup>, E. Abadie<sup>2</sup>,

M. Geiger<sup>1</sup>, T. LePrêtre<sup>1</sup>, J. Molgo<sup>4</sup>, J. Quéré<sup>3</sup>,

N. Chomérat<sup>2</sup>, E. Nézan<sup>2</sup>, G. Deslanglois<sup>5</sup>, V. Fessard<sup>5</sup>, Z. Amzil<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire Phycotoxines, IFREMER - Nantes

<sup>2</sup> Unité Littorale, IFREMER - Sète

<sup>3</sup> Unité Dyneco, IFREMER - Plouzané

<sup>4</sup> CNRS, Lab. Neurobiologie & Développement, UPR 3294-Gif sur Yvette

<sup>5</sup> ANSES, Unité de toxicologie des contaminants, Fougères

# 2010

Échantillons de vigilance:

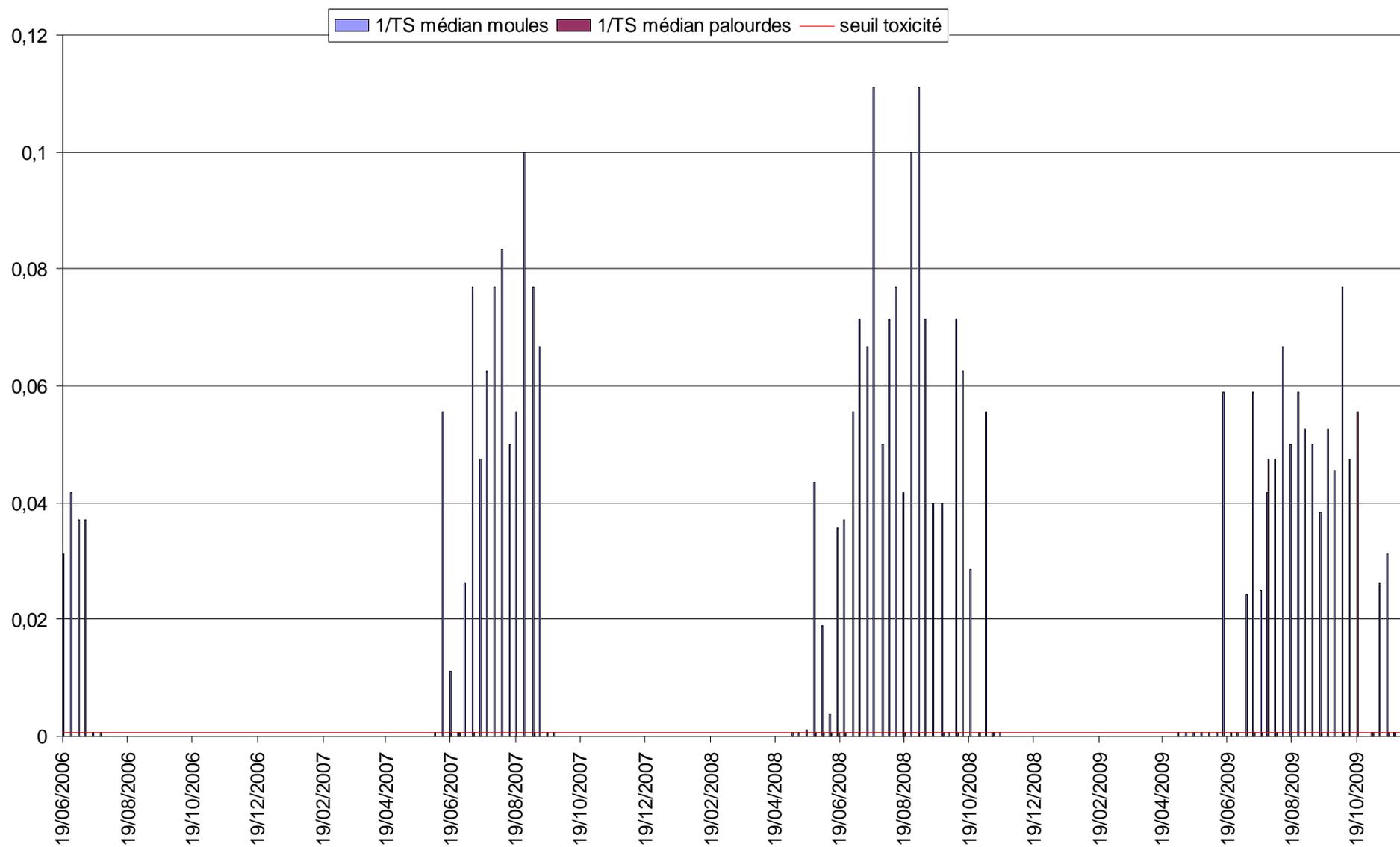
Données obtenues par l'institut  
Vétérinaire Norvégien à Oslo

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

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

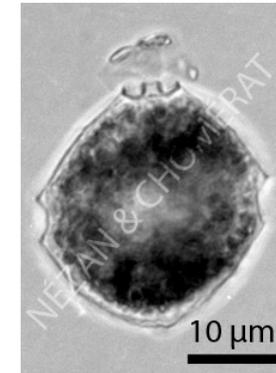
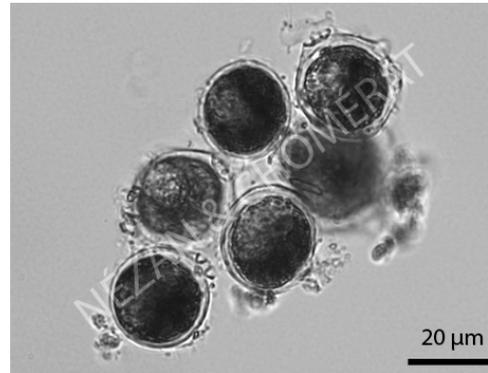


**Vulcanodinium rugosum gen. et sp. nov. (Dinophyceae),  
 un nouveau dinoflagellé marin  
 de la côte méditerranéenne française**

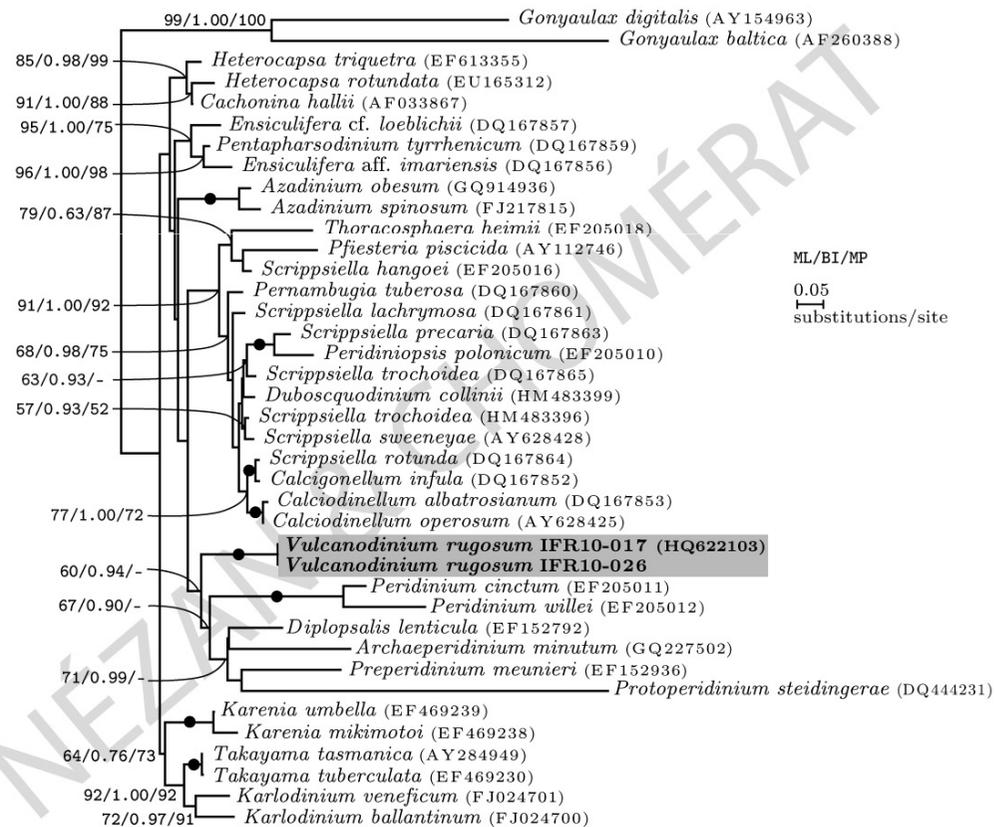
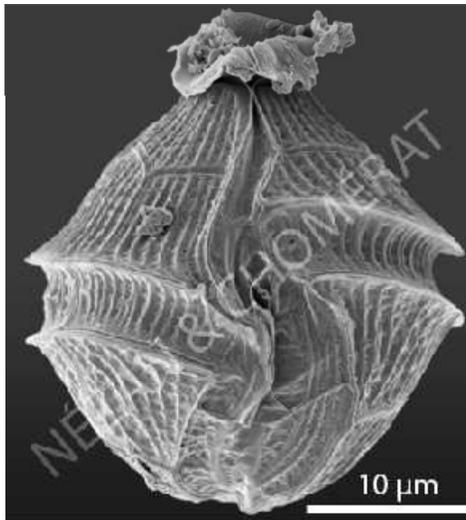
Elisabeth NÉZAN\* & Nicolas CHOMÉRAT

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

PERIDINIALES

THORACOSPHAERALES  
 PHYTODINIALES

PERIDINIALES

PERIDINIALES

GYMNODINIALES

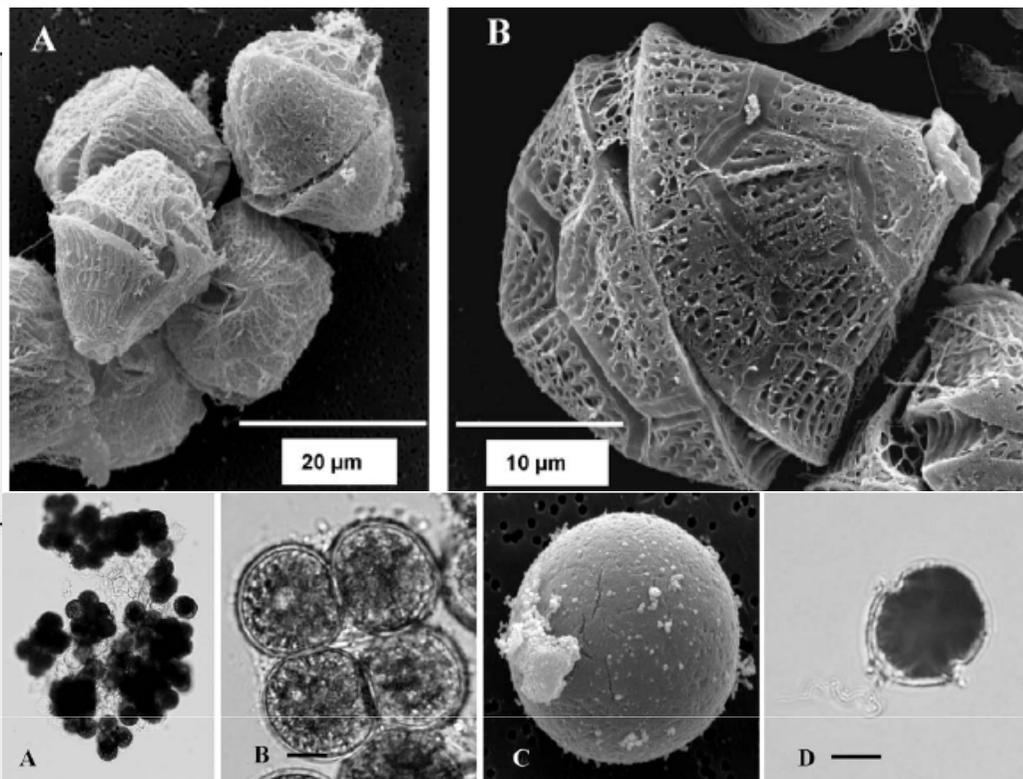
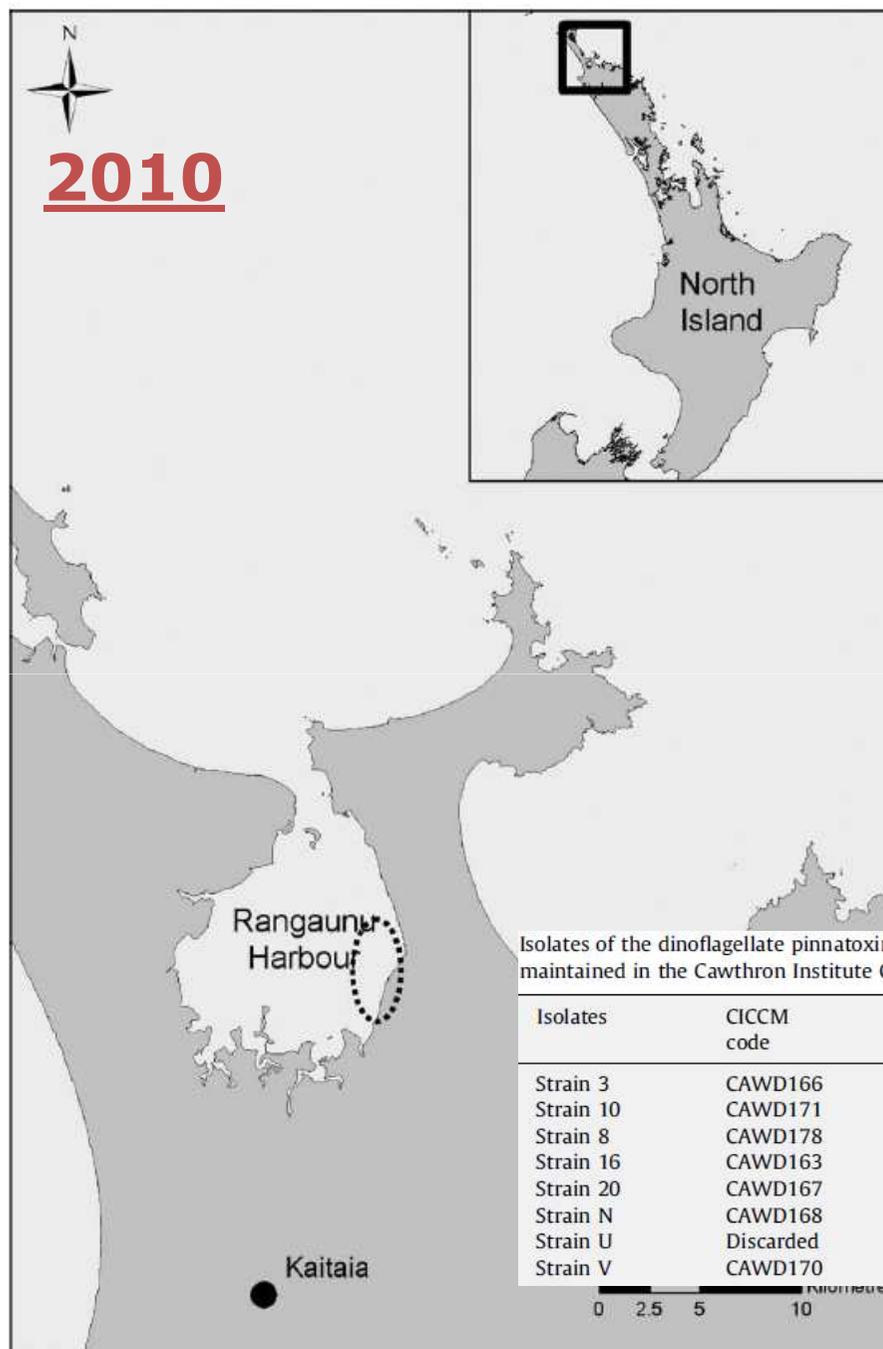
GO

P

GY

# L'Étang d'Ingril – Lagune méditerranéenne





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

Isolates	CICCM code	Pinnatoxin E (pg cell <sup>-1</sup> )	Pinnatoxin F (pg cell <sup>-1</sup> )
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

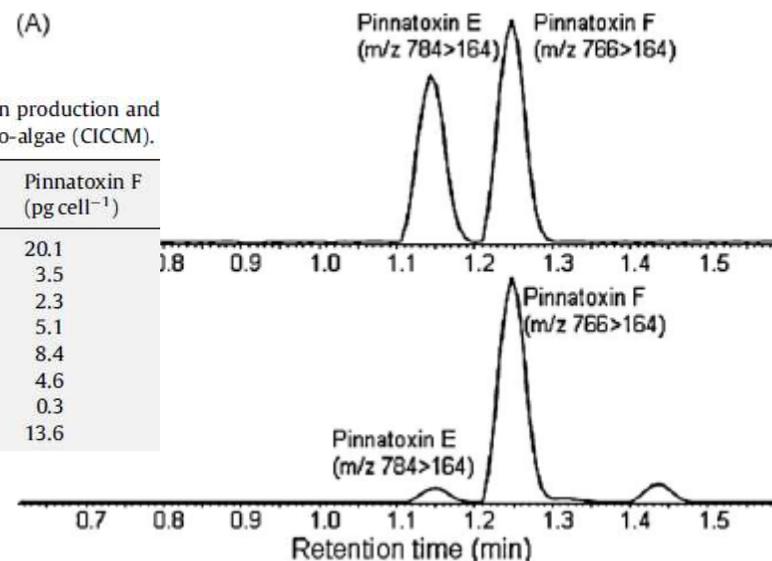
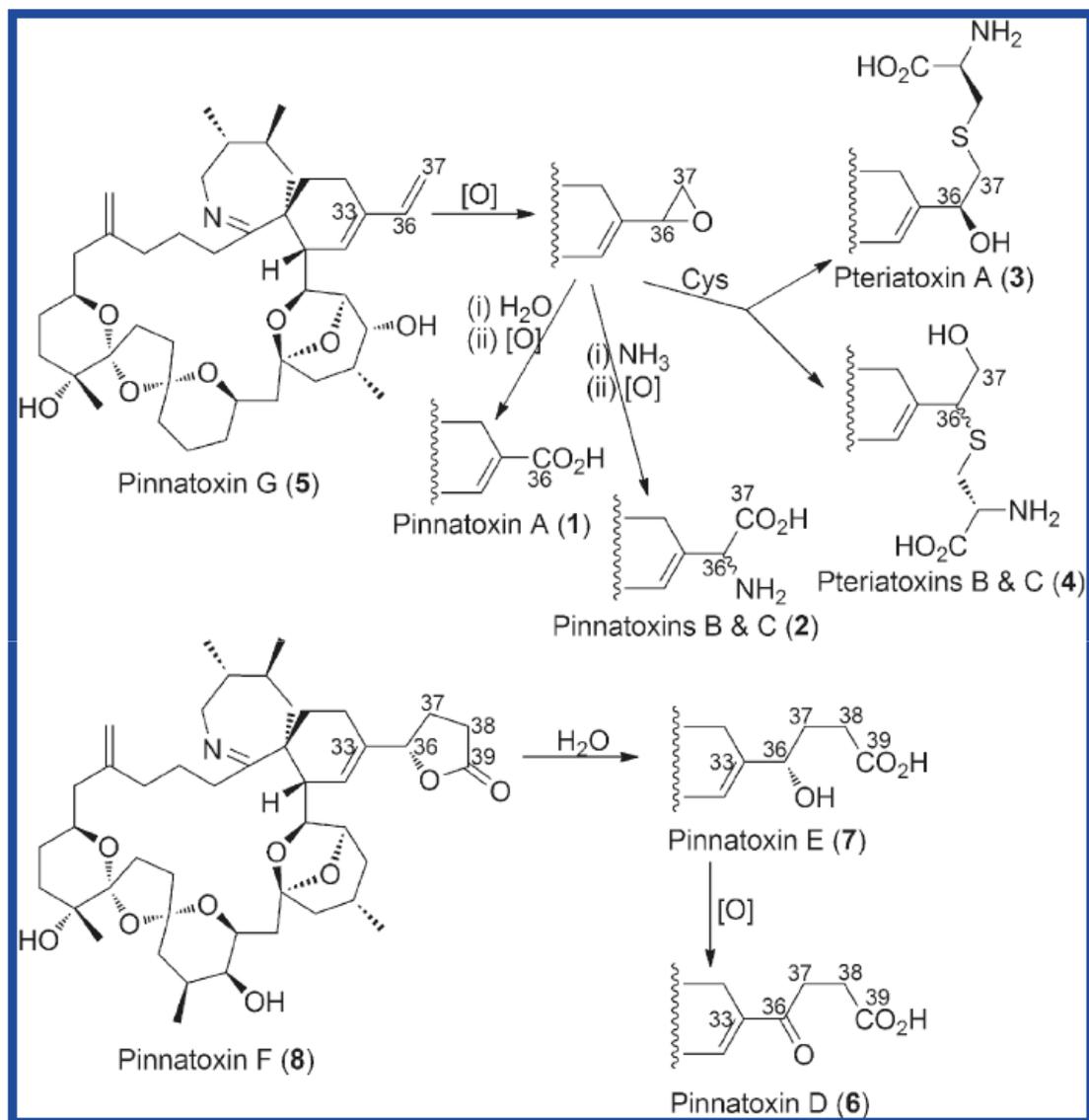


Fig. 1. Map of Rangaunu Harbour, Northland, New Zealand showing the 2009 sampling site.

## Pinnatoxins, Shellfish Toxins That Cause Food Poisoning

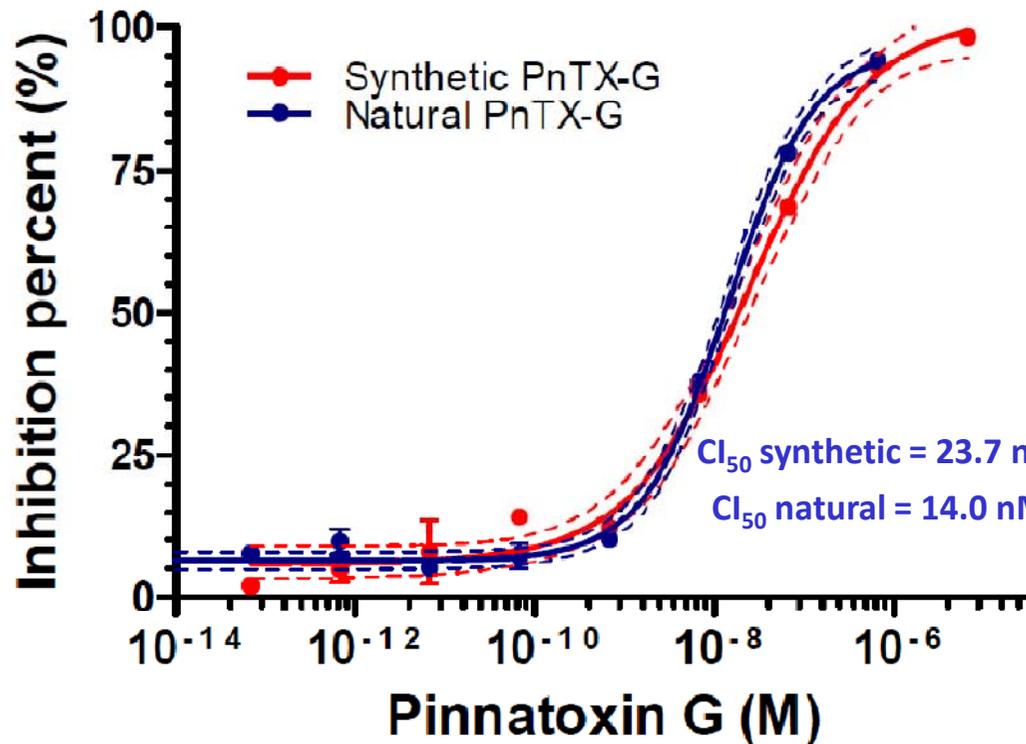
We discovered pinnatoxins after conducting our research on halichondrins. We isolated pinnatoxins A–D (5–8) and determined their structures as  $\text{Ca}^{2+}$  channel activators from the bivalve *Pinna pectinata* (Fig. 3).<sup>21</sup> There have been reports of shellfish poisoning on the coast of 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**

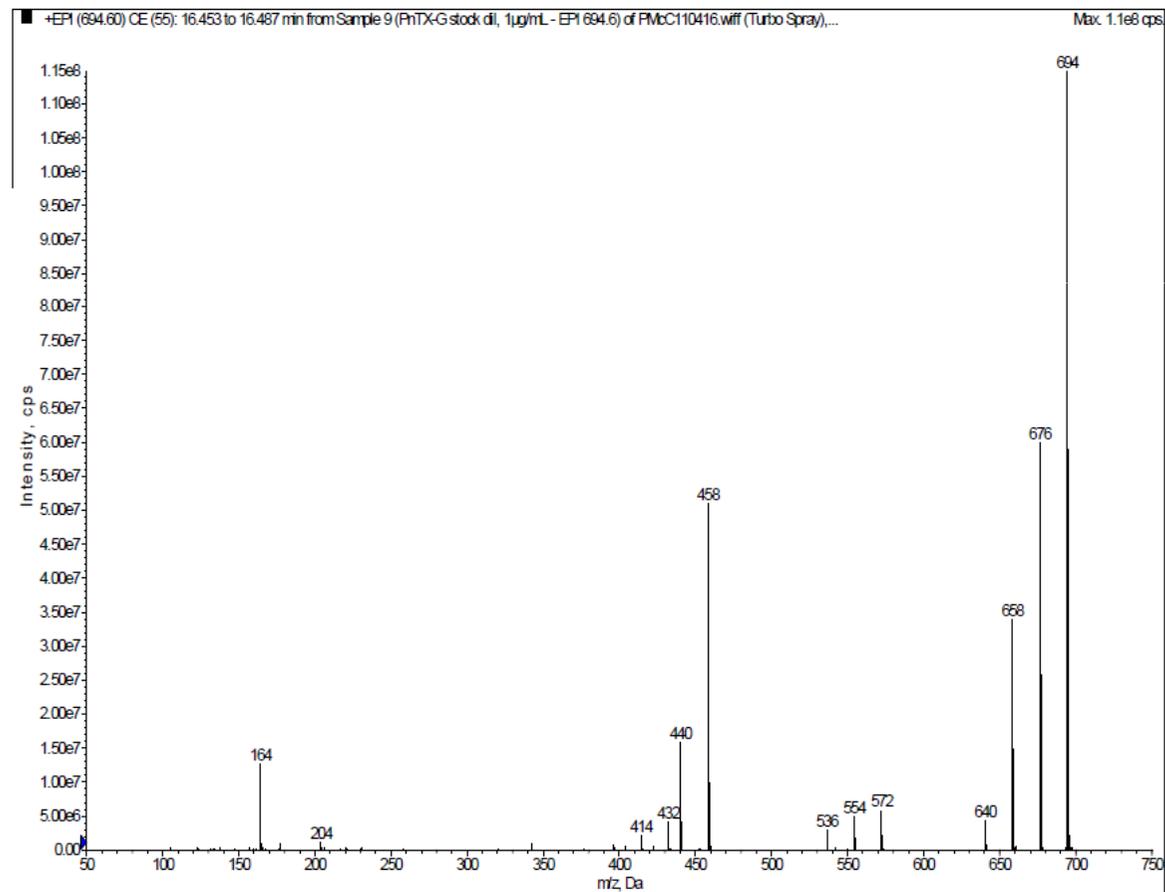


**Effet potentiel sur l'humain  
par les maladies du type  
Neuro-dégénératif !  
(Alzheimer, Parkinson ...)**

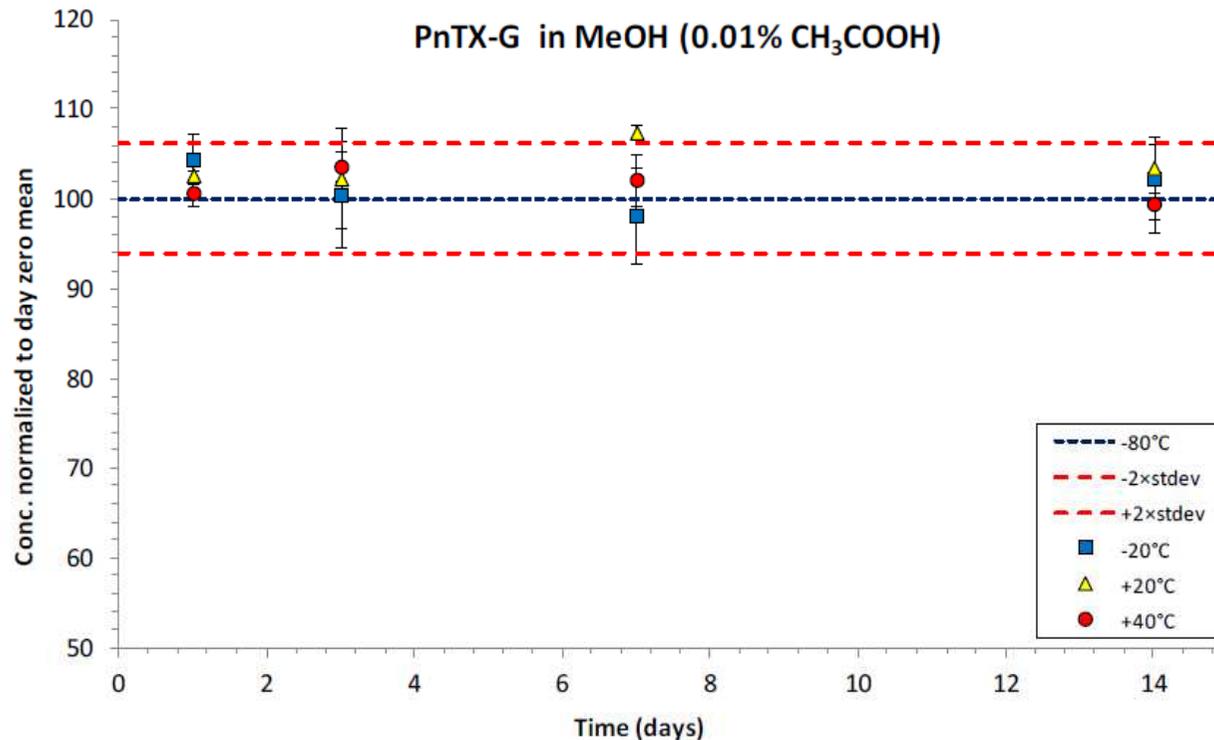
# Production d'un calibrant caractérisé pour la PnTX-G Contrat Ifremer – NRCC (McCarron et al.)

## 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).

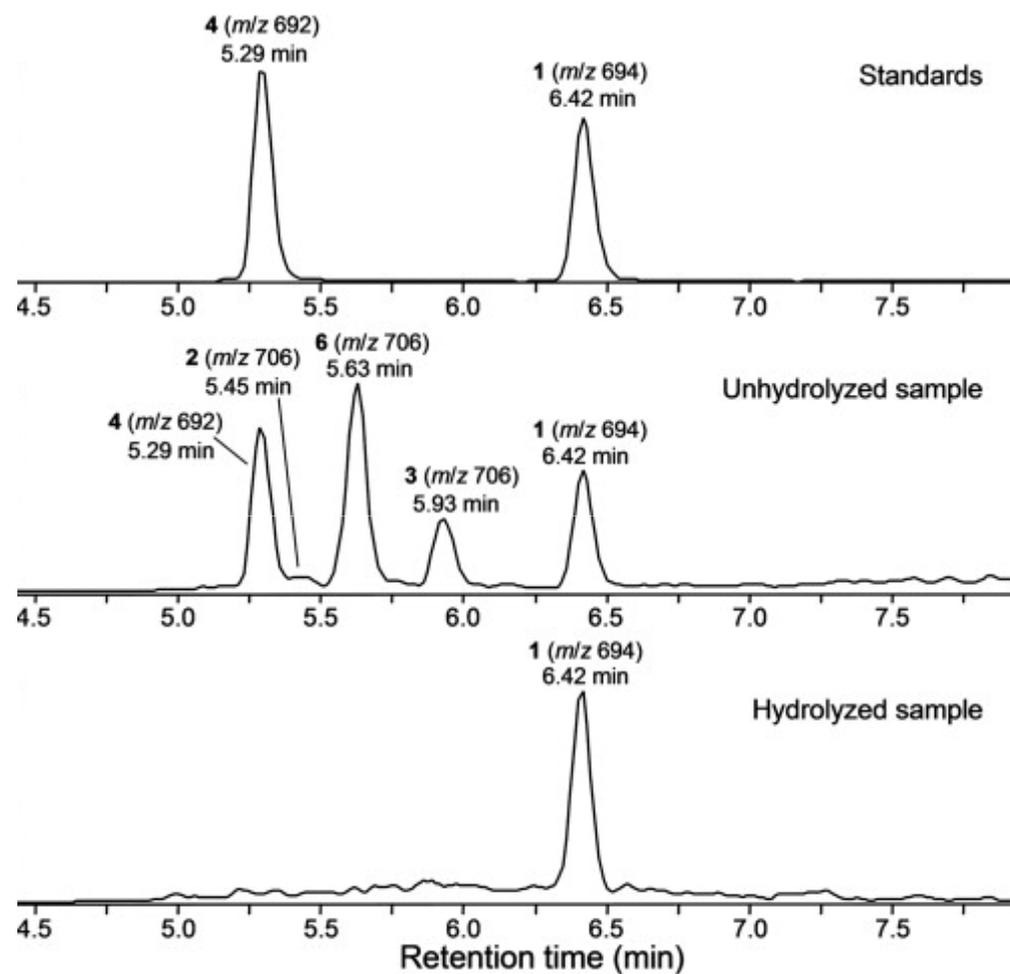


# Production d'un calibrant caractérisé pour la PnTX-G Contrat Ifremer – NRCC (McCarron et al.)



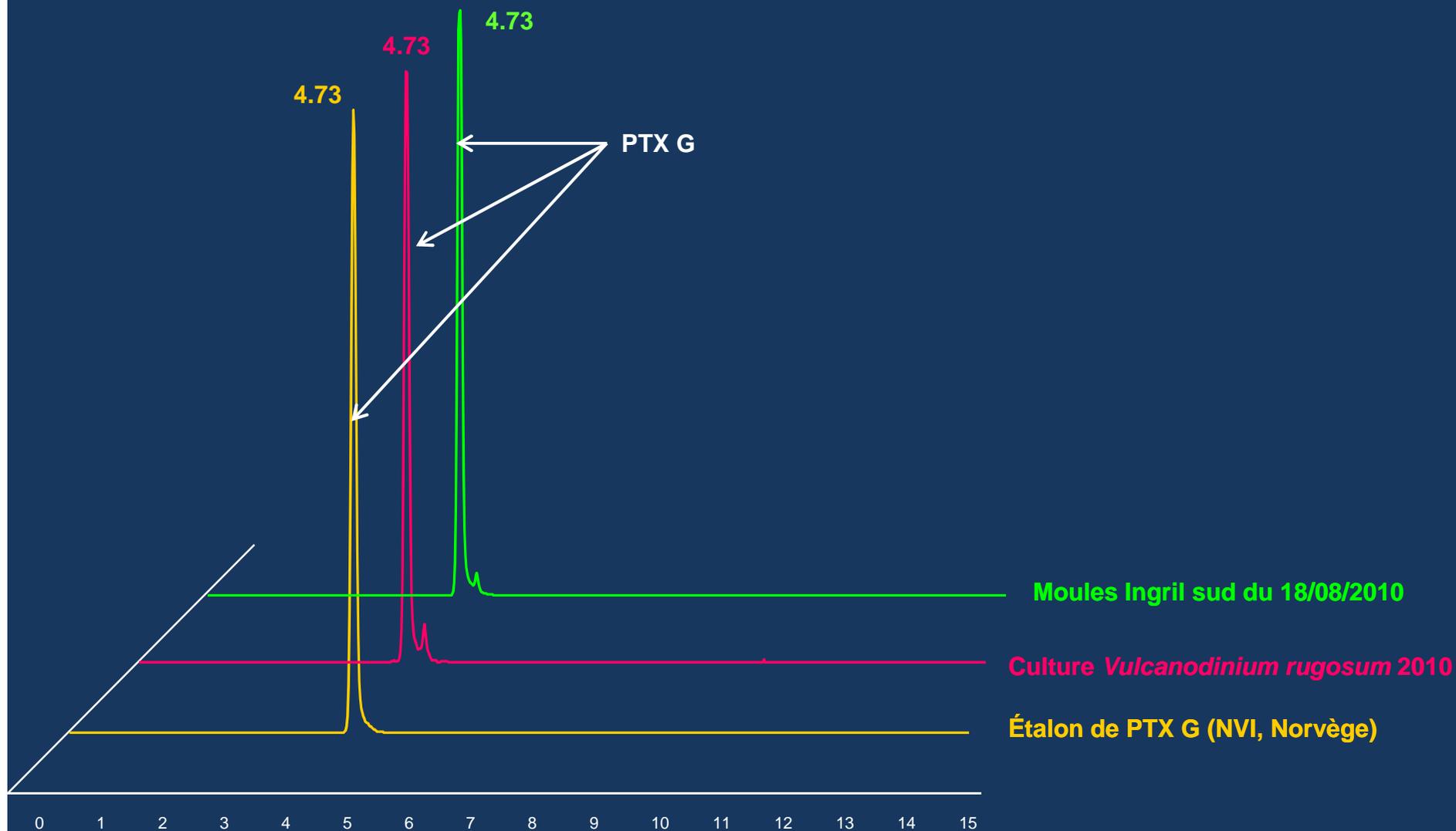
- Stockage durant 14 j à 40°C avec de l'acide faible (acétique) ne dégrade pas la toxine !
- Toxine susceptible de survivre aux conditions de la digestion chez l'être humain !!

## PnTX-G est stable à travers l'hydrolyse alcaline

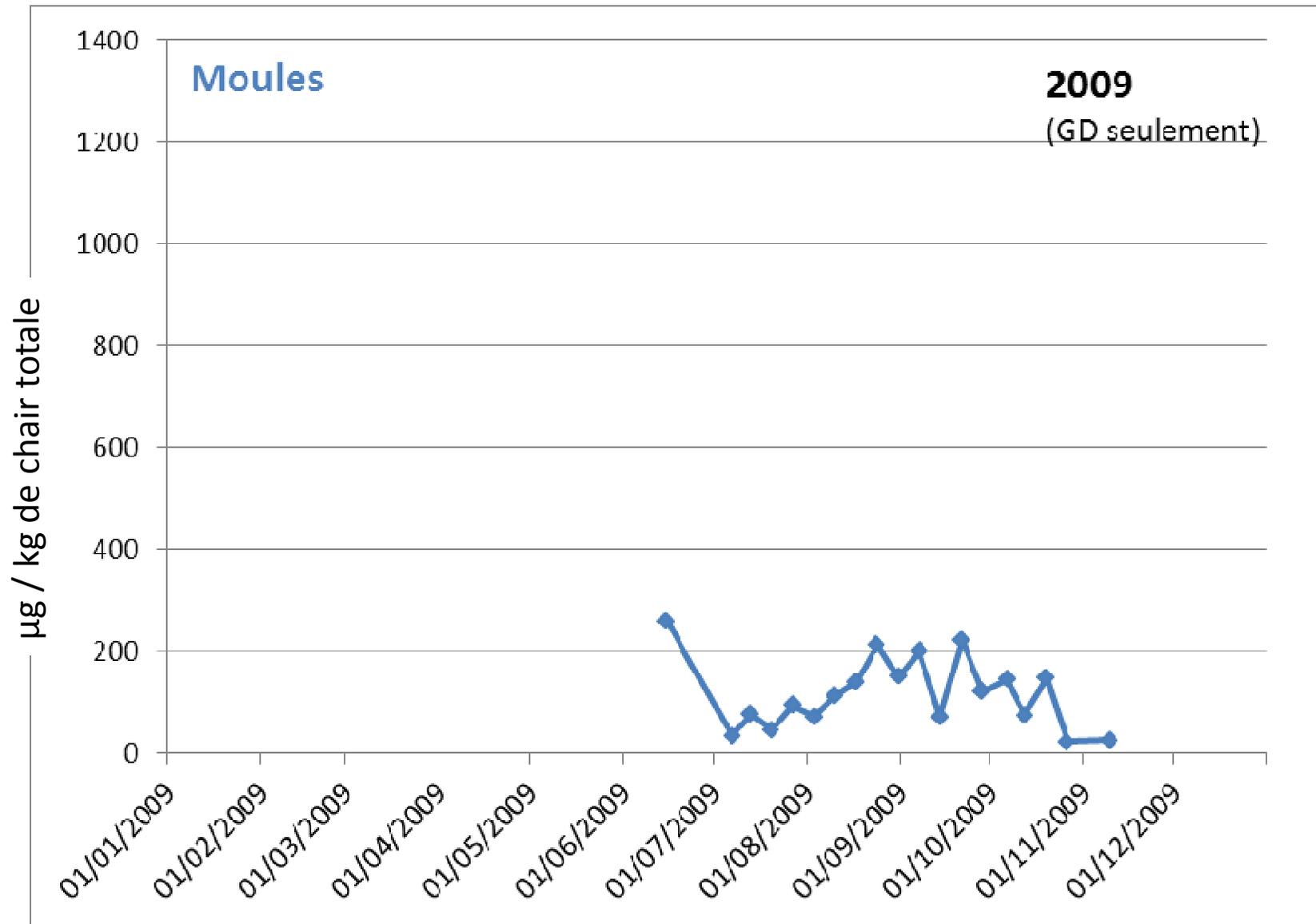


→ Toxine stable dans les conditions plus sévères que dans l'intestin !!

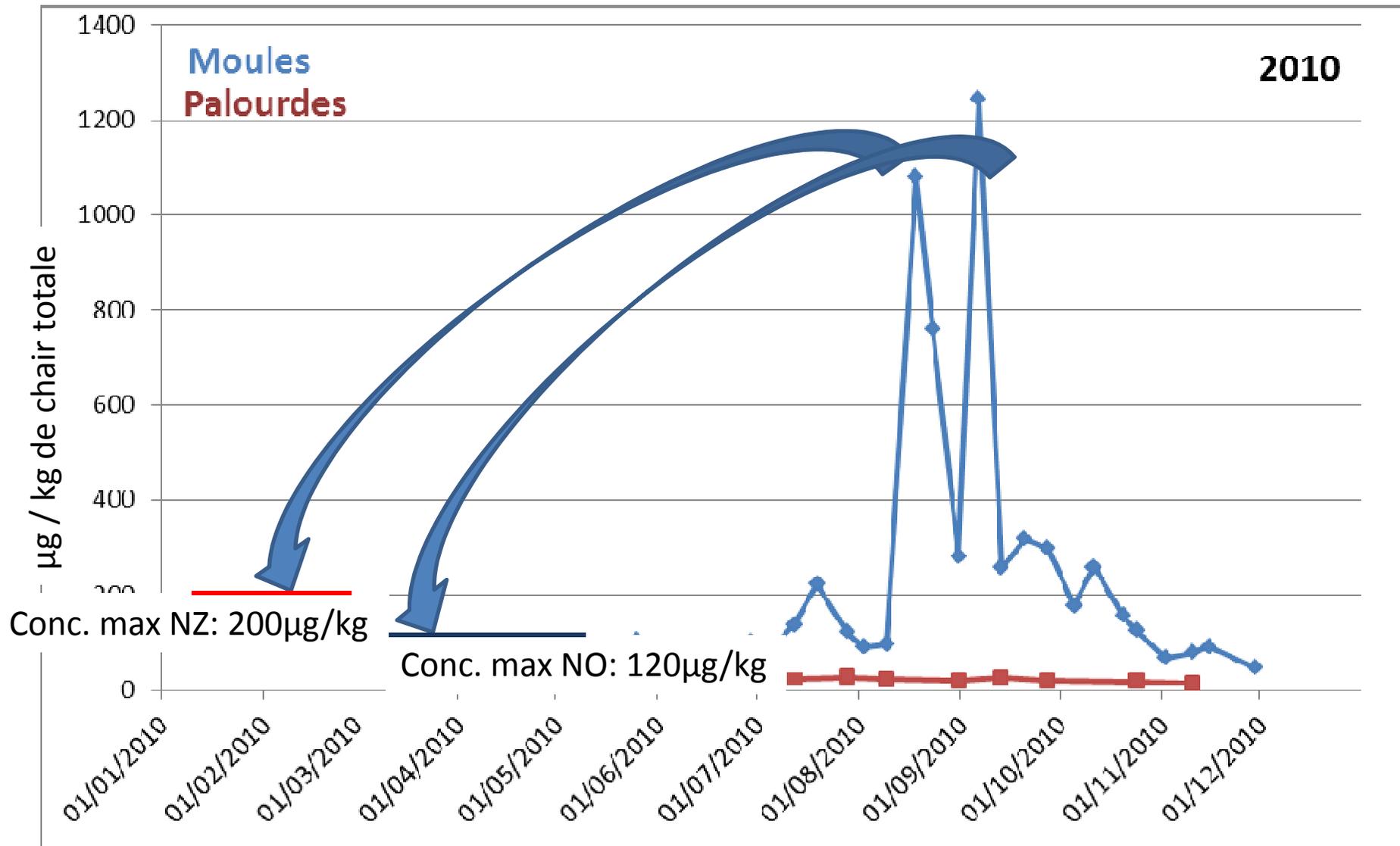
# Analyses de *V. rugosum*, étalon secondaire et échantillon de moule de l'Etang d'Ingril



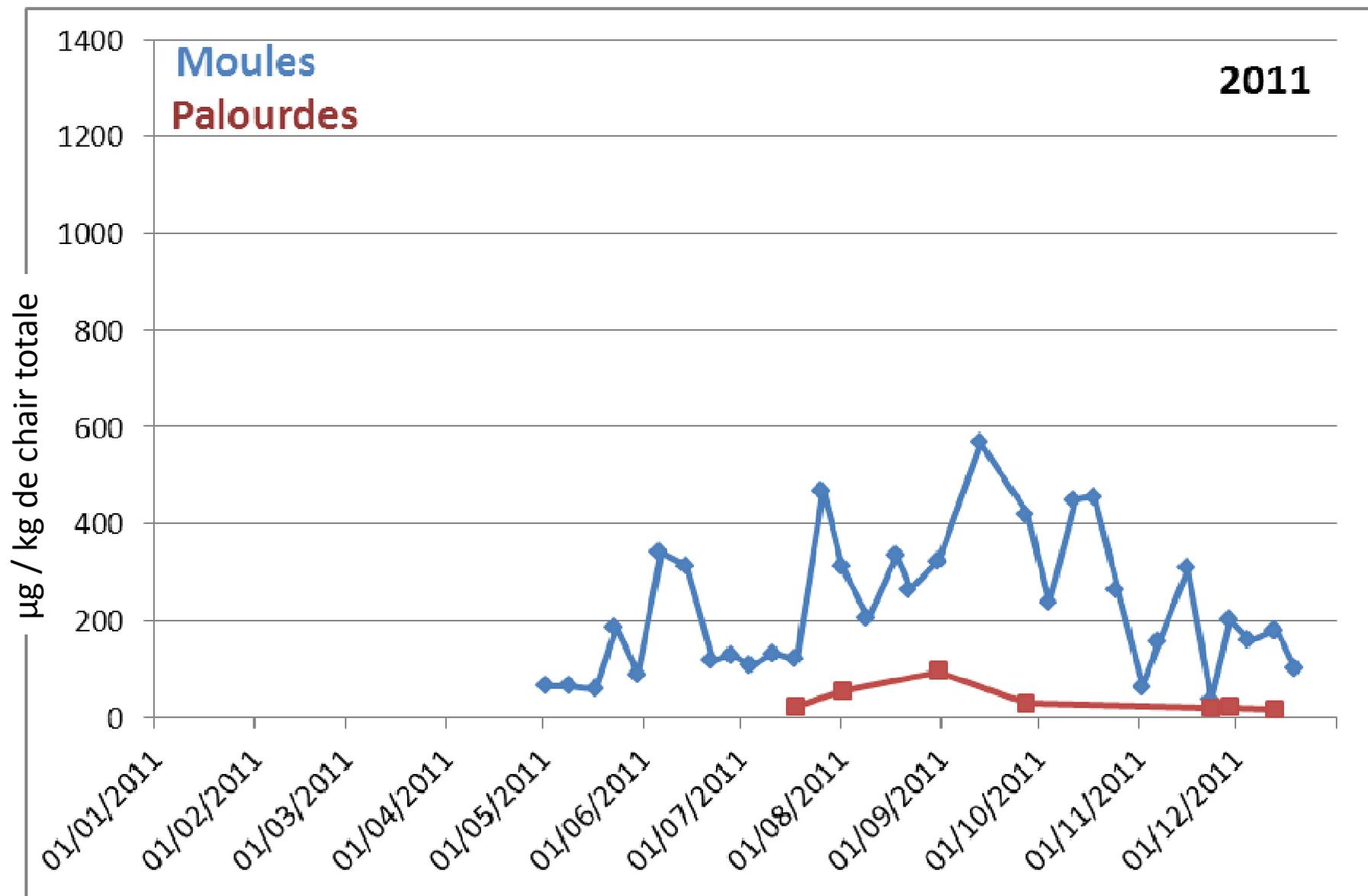
# Ingril 2009 – ré-analysé en 2012



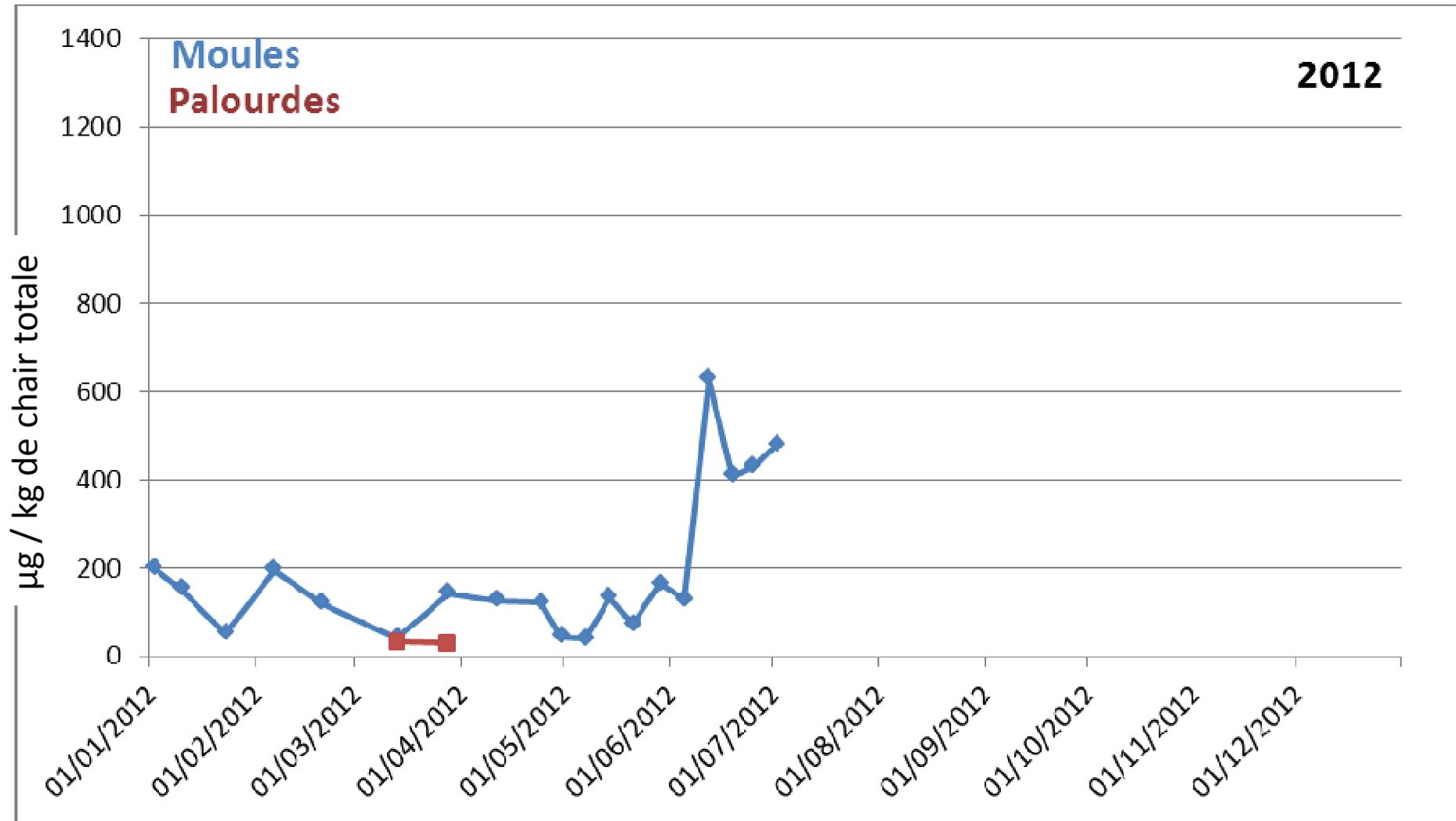
# Ingril 2010 – ré-analysé en 2012



# Ingril 2011



# Ingril 2012

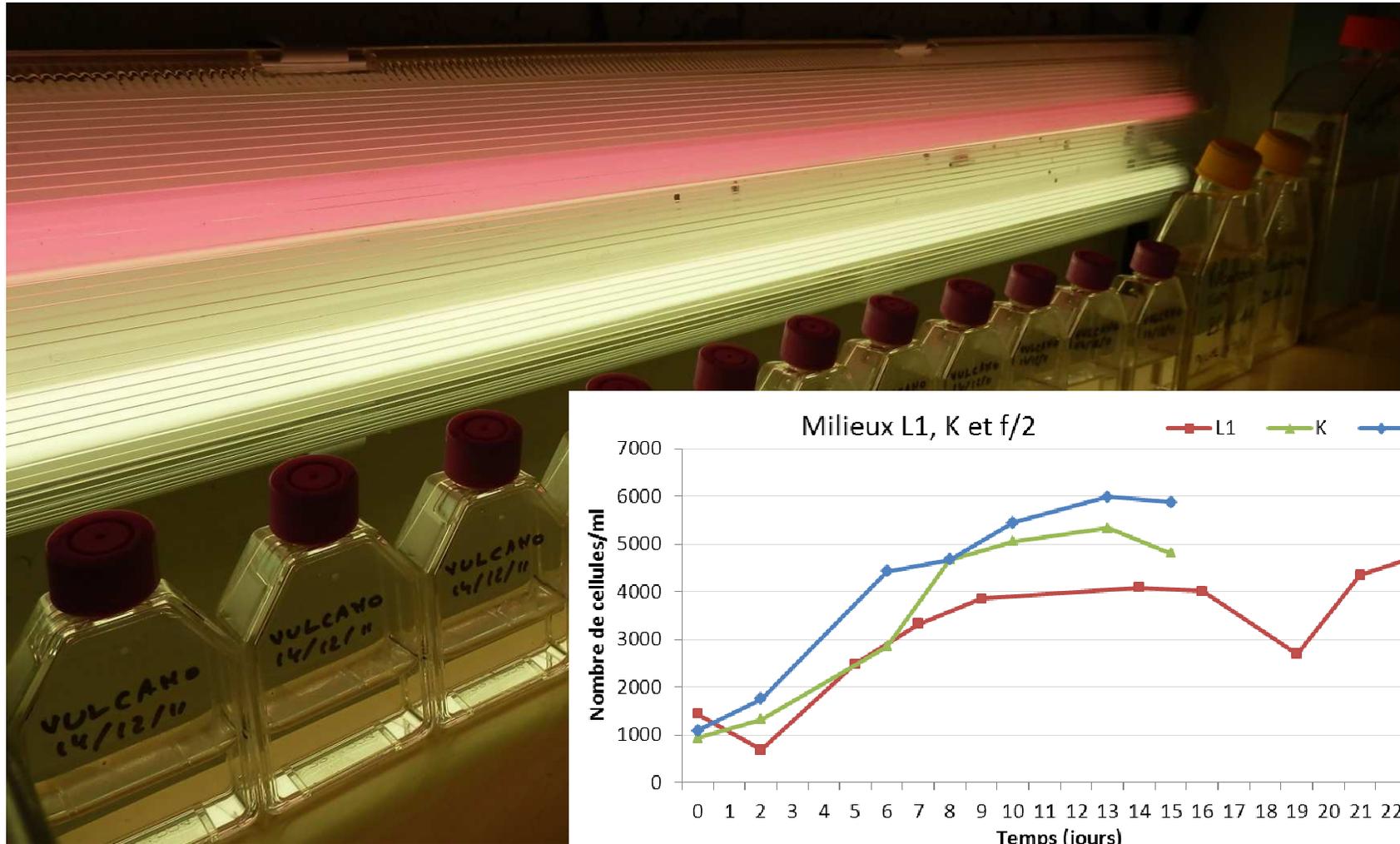


## Comparaisons des niveaux de contamination entre moules et palourdes, ainsi qu'entre les ratios des pinnatoxines G et A dans moules et dans les palourdes

	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 ?

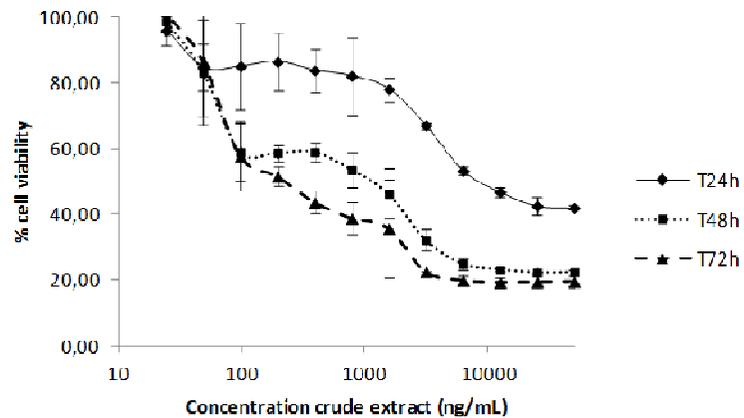
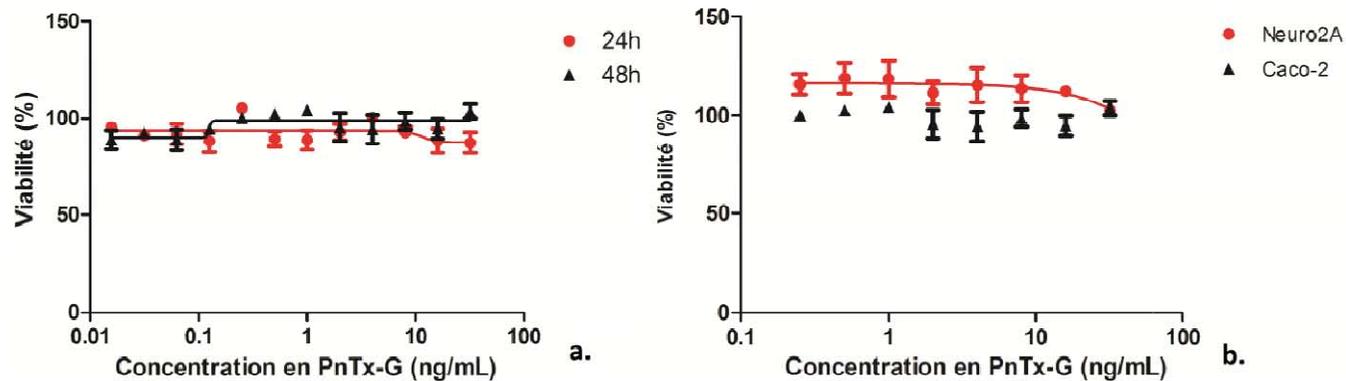
# Culture de *V. rugosum*

## - 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 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w.)	Parameter	Reference
GYM A (crude extract)	450	LD <sub>50</sub>	Seki et al. (1995)
GYM A (crude extract)	700	MLD	Stewart et al. (1997)
GYM A (> 95 % pure)	96 (CI 79-118)	LD <sub>50</sub>	Munday et al. (2004)
GYM A	80	LD <sub>50</sub>	Kharrat et al. (2008)
GYM B	800	LD <sub>50</sub>	Kharrat et al. (2008)
(+)-PnTX A	135	LD <sub>99</sub>	Uemura et al. (1995)
(+)-PnTX A	180	LD <sub>99</sub>	McCauley et al. (1998)
(-)-PnTX A (synthetic)	5000	no effect observed	McCauley et al. (1998)
PnTXs B and C <sup>(a)</sup>	22	LD <sub>99</sub>	Takada et al. (2001a)
PnTX D	400	LD <sub>99</sub>	Chou et al. (1996a)
PnTX E	45 (CI 32-58)	LD <sub>50</sub>	Selwood et al. (2010)
PnTX F	16	LD <sub>50</sub>	Selwood et al. (2010)
PnTXs E and F <sup>(b)</sup>	13 (CI 12.5-15.8)	LD <sub>50</sub>	Rhodes et al. (2010)
PnTX G	50 (CI 35-66)	LD <sub>50</sub>	Selwood et al. (2010)
PtTX A	100	LD <sub>99</sub>	Takada et al. (2001b)
PtTX B and C <sup>(a)</sup>	8	LD <sub>99</sub>	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 LD<sub>50</sub> of algal extract containing approximately 10  $\mu\text{g}$  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 <sub>50</sub> (μg/kg) <sup>a</sup>	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 <sup>b</sup>
Pinnatoxin G	Fed	150 (105–199)	75

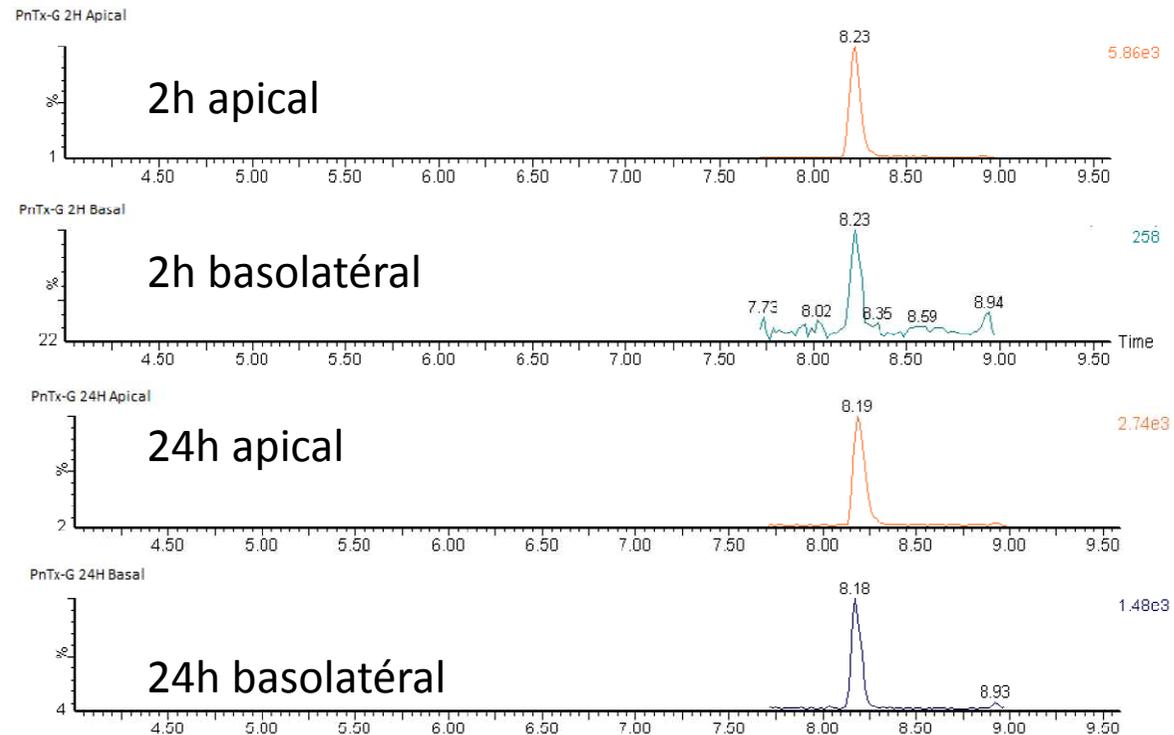
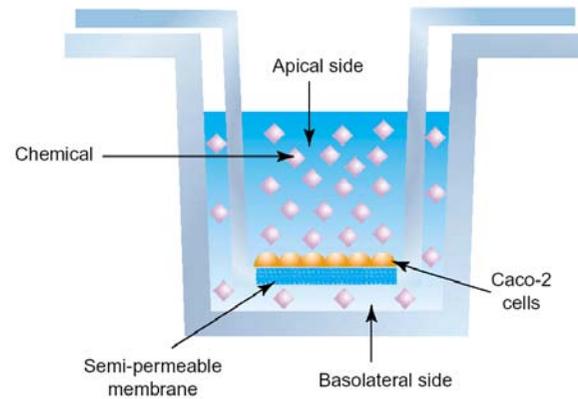
<sup>a</sup> Figures in brackets indicate 95% confidence intervals.

<sup>b</sup> 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  $\mu$ algues pélagiques

Toxicité cellulaire de l'ordre du picogramme/cellule

## Pinnatoxines :

PnTX-G : analogue prévalent en  $\mu$ 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, 200

Questions?

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

