

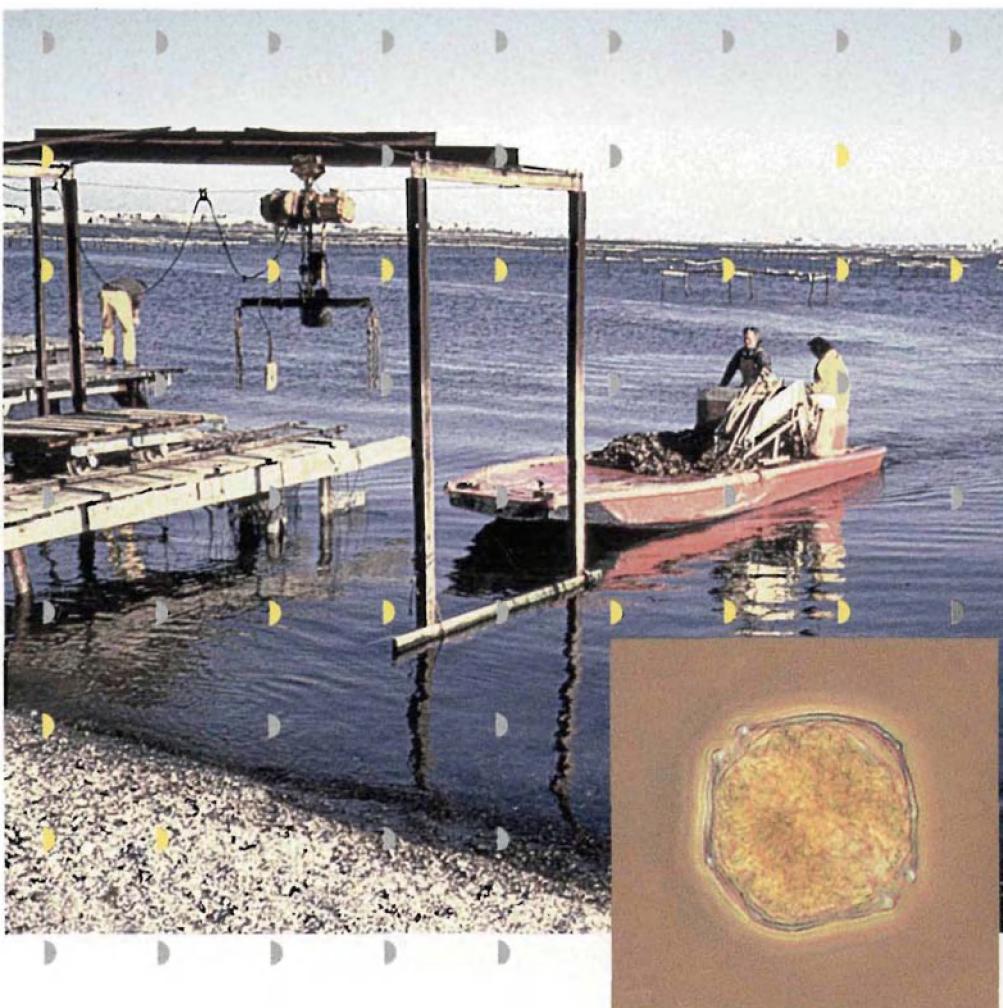
Contamination de l'étang de Thau par *Alexandrium tamarensense*

Épisode de novembre à décembre 1998

Coordinateur
Patrick Lassus

Observation et surveillance
de la mer côtière

bilans & prospectives



Ifremer

Retrouvez le [catalogue en ligne](#) des publications récentes du Service des Editions de l'Ifremer à l'adresse.

Découvrez également un ensemble de documents scientifiques, accessibles gratuitement, dans [Archimer](#).

Contamination de l'étang de Thau par *Alexandrium* *tamarensse*

Épisode de novembre
à décembre 1998

Éric Abadie¹, Zouher Amzil², Catherine Belin²,
Marie-Annick Comps¹, Panayota Elzière-Papayanni³,
Patrick Lassus², Claude Le Bec¹,
Claire Marcaillou-Le Baut², Élizabeth Nézan⁴,
Robert Poggi²

Ifremer

¹ Ifremer-Sète

² Ifremer-Nantes

³ direction des services vétérinaires de l'Hérault

⁴ Ifremer-Concarneau

Avant-propos

Les proliférations phytoplanctoniques côtières de microalgues susceptibles de provoquer l'accumulation de toxines dans les coquillages filtreurs sont connues depuis longtemps. Cependant, ce problème n'a commencé à concerner sérieusement le littoral français - du point de vue de la santé du consommateur - que depuis 1983. Dès 1984, l'Ifremer se dotait d'un réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines (Réphy), afin de fournir aux administrations concernées les données analytiques nécessaires à la prise de décision.

Ces dix dernières années, le littoral méditerranéen a été peu touché par les épisodes de prolifération de *Dinophysis* (dinoflagellé producteur de toxines diarrhéiques), et apparemment épargné par les manifestations d'un genre plus dangereux, *Alexandrium*, producteur de neurotoxines paralysantes.

Pour la première fois, en novembre et décembre 1998, l'espèce *Alexandrium tamarense* s'est manifestée dans l'étang de Thau à des concentrations cellulaires suffisantes pour rendre certains coquillages (moules, palourdes) impropre à la consommation.

Cet événement a également été décelé par les services vétérinaires au niveau du plan de surveillance des denrées d'origine marine dans les circuits commerciaux. L'Ifremer et le Cneva, devenu l'Afssa, ont donc joint leurs efforts pour contrôler un phénomène relevant à la fois des conditions environnementales et de la santé publique, et dont les implications restent encore à évaluer.

Afin de constituer un enregistrement aussi factuel que possible de cet épisode exceptionnel et une base des réflexions futures sur les conséquences à en tirer, la présente synthèse a été préparée suivant quatre points :

- un rappel des données scientifiques connues au plan international ;
- un constat des impacts sur les activités conchylicoles ;
- un historique et un bilan opérationnel des actions de surveillance ;
- un rappel du contexte réglementaire.

Je remercie à cette occasion tous les contributeurs à ce travail, qu'ils appartiennent à l'Afssa, à l'Ifremer ou à des services vétérinaires départementaux, pour leur participation en tant que rédacteurs ou comme membres du comité de lecture.

Bruno Barnouin

Sommaire

| | |
|--|----|
| Avant-propos | 3 |
| Introduction : rappel des objectifs de cette synthèse | 6 |
| | |
| <u>Chapitre I : État de l'art</u> | |
| Les contaminations PSP en France avant 1998 | 9 |
| Identification de l'algue responsable | 11 |
| Généralités sur <i>A. tamarense</i>. Les autres <i>Alexandrium</i> signalés en Méditerranée | 12 |
| Les contaminations par phycotoxines à Thau avant 1998 | 14 |
| | |
| <u>Chapitre II : Les méthodes utilisées par le Réphy</u> | |
| Analyses planctoniques et tests de toxicité | 17 |
| Évolution des méthodes et analyses de confirmation | 18 |
| Les tests biologiques sur souris utilisés pour la surveillance des DSP/PSP | 18 |
| Les méthodes physico-chimiques SP/PSP | 19 |
| Problèmes posés par le test de dépistage des DSP sur souris | 20 |
| Méthodes proposées pour remplacer le test sur souris DSP | 21 |
| La réglementation | 22 |
| | |
| <u>Chapitre III : Observations réalisées en novembre 1998</u> | |
| Chronologie des décisions administratives | 27 |
| Données biologiques et toxicologiques | 29 |
| Identification du phénomène | 29 |
| Évolution | 30 |
| Données hydrologiques et météorologiques | 32 |
| | |
| <u>Chapitre IV : Discussion, perspectives</u> | |
| Analyse du traitement de la crise | 35 |
| Propositions | 35 |
| | |
| Glossaire | 37 |
| Références bibliographiques | 38 |
| Annexes | 39 |
| Données brutes | 40 |
| Sommaire du plan qualité Réphy | 42 |

Introduction : rappel des objectifs de cette synthèse

Fin octobre 1998, le laboratoire vétérinaire départemental des Bouches-du-Rhône met en évidence la présence de composés toxiques dans des moules provenant de l'étang de Thau (littoral méditerranéen, côte du Languedoc) tandis que le Réphy (réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines) détecte des concentrations importantes d'une espèce phytoplanctonique connue pour produire des toxines paralysantes (PSP) : *Alexandrium tamarense*. Les analyses effectuées sur les coquillages montrent que les moules contiennent des toxines PSP en quantité dangereuse pour les consommateurs. Conformément à ce que prescrit la réglementation dans un tel cas et compte tenu du fait qu'il s'agit du premier épisode toxique à *A. tamarense* en France, tous les coquillages de l'étang (moules, mais aussi huîtres et palourdes) sont soumis à une interdiction de commercialisation et de ramassage.

La particularité de cet épisode, qui a duré deux mois et a soulevé de nombreux problèmes, résulte de la conjonction de plusieurs phénomènes nouveaux :

- *Alexandrium tamarense* n'avait jamais été observé à de telles concentrations - près de 100 000 cellules par litre - sur les côtes françaises. Or, la relation entre la concentration d'une espèce toxique dans l'eau et le niveau de toxicité résultant dans les coquillages n'est jamais simple, et dépend de plusieurs facteurs : la toxicité d'une espèce d'*Alexandrium* peut être variable d'une souche à une autre et les différentes espèces de coquillages ne se contaminent pas toujours de la même façon ;
- le suivi des coquillages « mis sur le marché » a également été effectué en parallèle par les services vétérinaires dès le début du phénomène dans le cadre de leur plan de surveillance vis-à-vis des phycotoxines. L'utilisation de proto-

coles de surveillance différents dans l'un et l'autre organismes a conduit à des résultats différents, difficilement acceptables par les exploitants conchylicoles concernés ;

- l'implication des professionnels conchylicoles dans une tentative de gestion de l'événement a été particulièrement importante, puisque de nombreuses analyses de toxines ont été effectuées à leur initiative dans des laboratoires privés. De la même façon, les informations relatives au risque de contamination en cas de transfert des coquillages vers d'autres régions françaises ou européennes ont largement circulé au sein de la profession, même si les recommandations afférentes n'ont pas toujours été suivies.

L'ensemble de ces facteurs a contribué à une réflexion générale sur les améliorations à envisager pour la surveillance de ces épisodes. En ce qui concerne le Réphy, la stratégie générale a dû être renforcée, à savoir l'importance des observations d'espèces phytoplanctoniques dans le milieu, qui déterminent la réalisation de tests de toxicité dans les coquillages. Néanmoins, l'analyse fine de la succession des événements de Thau a montré que le nombre de points de prélèvement et la fréquence des prélèvements sont particulièrement critiques dans un épisode de ce type, à savoir le développement soudain d'une espèce jusqu'alors minoritaire dans une zone qui n'était pas considérée à risque jusqu'à maintenant.

L'objectif de cette synthèse consiste donc à tirer un premier bilan des événements toxiques de novembre et décembre 1998, que ce soit sur les plans scientifiques (première prolifération notable de ce dinoflagellé toxique en France), appliqués (évolution de la contamination des coquillages, problèmes de transfert), opérationnels (gestion d'un épisode de crise, fonctionnement du réseau de surveillance) ou réglementaires. L'analyse *a posteriori* des difficultés rencontrées et des premiers résultats obtenus devrait permettre d'envisager des propositions d'action pour l'avenir, non seulement dans le cadre de l'étang de Thau mais également pour toute zone du littoral susceptible d'une contamination similaire.

Chapitre I

État de l'art

État de l'art

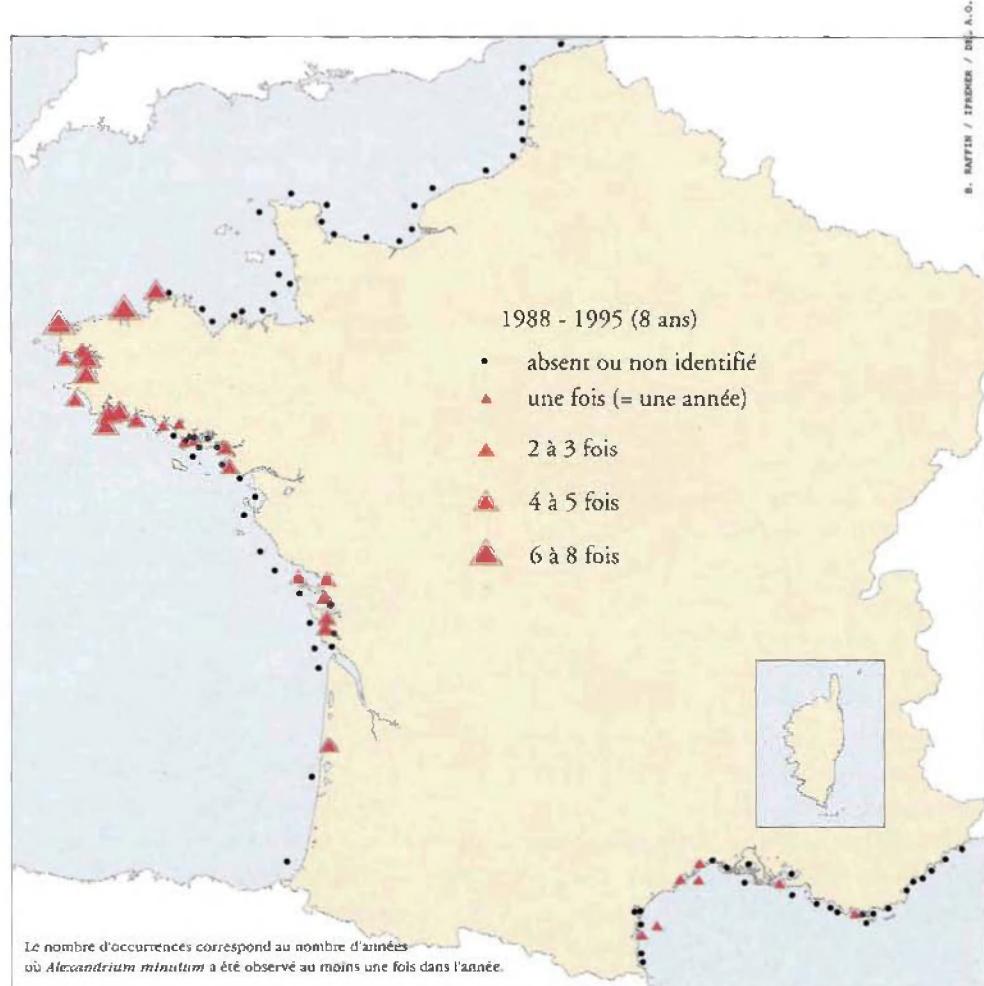
Les contaminations PSP en France avant 1998

Avant 1998, *A. tamarensis* n'a été observé que rarement sur les côtes françaises, et toujours à très faible concentration : le maximum détecté par le Réphy en Atlantique est de 1 500 cellules par litre en baie de Douarnenez en 1996. Cependant, l'étang de Thau avait déjà connu un développement fugace de cette espèce en juillet 1995 (20 000 cellules/litre). Aucune conséquence toxique n'avait été associée à cet épisode.

La première mise en évidence de toxines PSP dans les coquillages du littoral français date d'août 1988, suite à un bloom d'*Alexandrium minutum* dans les abers (Finistère). Lors de cette contamination, les moules et les huîtres ont été toxiques simultanément, et la fermeture de la zone a duré un mois. L'année sui-

vante, la baie de Morlaix, dans la même région, était également touchée, puis, en 1996, une troisième zone de Bretagne Nord : l'estuaire de la Rance. Des fermentures pour toxicité PSP ont été régulièrement prononcées en baie de Morlaix : tous les ans de 1989 à 1997 inclus, excepté en 1991. Dans les abers, par contre, l'épisode de 1988 ne s'est renouvelé qu'en 1995. La Rance, enfin, a subi des interdictions en 1996 et 1998.

Les concentrations observées d'*Alexandrium minutum* atteignent fréquemment plusieurs millions, voire plusieurs dizaines de millions de cellules par litre en baie de Morlaix. Elles sont plus variables dans les abers - au maximum 6 millions de cellules par litre - et n'ont jamais dépassé 800 000 cellules par litre dans la Rance. Les blooms suivis d'épisodes de toxicité se produisent toujours entre juin et septembre. Les données actuelles montrent que, dans ces zones, *A. minutum*, espèce peu toxique, ne



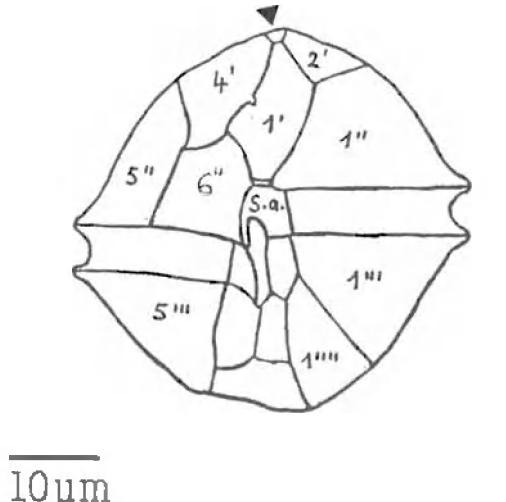


Figure 2

Vue ventrale d'*Alexandrium tamarense* montrant l'imbrication des plaques de la thèque et mise en évidence du pore ventral (microphotographie) par séparation des plaques
1' et 4' de l'épithèque d'une cellule prélevée à Thau le 3 novembre 1998.

devient dangereux que s'il se développe en quantité importante : au minimum 100 000 cellules par litre.

Les quantités de toxines PSP habituellement observées en Bretagne Nord sont variables, mais généralement inférieures à 400 µg équivalent STX pour 100 g de chair. Si on compare cette concentration à celle détectée chez les moules de l'étang de Thau les premières semaines, soit 850 µg équivalent STX pour 100 g, on constate, dans ce cas, le niveau élevé de la contamination, qui est plus de dix fois supérieur au seuil réglementaire retenu à l'échelle internationale (80 µg équivalent STX pour 100 g). Il faut noter cependant que le niveau de toxicité atteint dans les abers bretons a culminé en 1995 à 1 000 µg équivalent STX pour 100 g chez les moules et 640 µg équivalent STX pour 100 g chez les huîtres.

A. minutum ne semble pas avoir été décrit sur le littoral français avant les années quatre-vingt : cette espèce pourrait avoir été introduite dans les eaux côtières de Bretagne Nord, mais il ne s'agit à l'heure actuelle que d'une hypothèse car aucune étude n'a été menée pour connaître l'origine de son apparition. Il est cependant fort probable que l'extension géographique constatée entre 1988 et 1998 dans cette région résulte de la capacité de l'espèce à s'enkyster pour résister à des conditions environnementales défavorables : deux campagnes de prélèvements, effectuées sur l'ensemble du littoral de Bretagne Nord en 1990 et 1996, ont montré que le nombre de zones dans lesquelles on a observé la présence

de kystes dans le sédiment a augmenté de façon significative en six ans.

A. minutum est également observé épisodiquement sur l'ensemble de la côte atlantique, mais toujours en faible concentration (fig. 1). Sa présence est rarement notée en Méditerranée, excepté deux blooms exceptionnels en rade de Toulon en 1990 et en 1994, qui ne se sont jamais renouvelés.

D'après la littérature mondiale, les toxines PSP s'accumulent préférentiellement dans les moules et les coquilles Saint-Jacques, mais les autres espèces telles que les huîtres et les palourdes n'échappent pas à une contamination d'un certain niveau. À titre d'exemple, les données disponibles sur les épisodes toxiques PSP observés en Bretagne Nord depuis 1988 montrent que les quantités de toxines détectées sur le même point de prélèvement, à la même date, sur des huîtres (*Crassostrea gigas*) et sur des moules (*Mytilus edulis*) sont très généralement supérieures chez les moules mais que le rapport entre les contaminations respectives des moules et des huîtres est extrêmement variable, y compris sur une échelle de temps restreinte : entre 1,5 et 3 pour les abers, entre 1 et 6 pour la baie de Morlaix.

L'existence de cultures d'espèces toxiques d'*Alexandrium* a permis de mener des études sur les processus de contamination et décontamination des coquillages. En particulier, des essais menés par l'Ifremer sur des moules et des palourdes mises en contact avec *A. minutum* ont montré que :

- la phase de contamination est rapide, ainsi que le début de la décontamination ;
- les palourdes nécessitent une concentration beaucoup plus élevée d'*A. minutum* pour se contaminer au même niveau que les moules ;
- la saxitoxine, un des composés les plus dangereux de l'ensemble des toxines PSP, n'est que peu ou pas présente dans l'algue mais peut apparaître dans le coquillage lors de la décontamination, par biotransformation des autres toxines.

La contamination expérimentale de coquilles Saint-Jacques par une souche d'*A. tamarensense* a révélé le rôle important des reins du mollusque dans la rétention prolongée des toxines, à des concentrations élevées, au cours de la phase d'épuration. L'essentiel des toxines se trouve, en effet, dans la glande digestive mais leurs proportions, au cours de l'épuration, augmentent dans les reins et la gonade alors qu'elles diminuent dans le muscle.

Identification de l'algue responsable

Fin octobre 1998, les caractères morphologiques des cellules rondes et aptes à former de courtes chaînes détectées dans l'étang de Thau ont très vite permis de dire qu'il s'agissait d'un *Alexandrium*. Il restait cependant à déterminer l'espèce en cause.

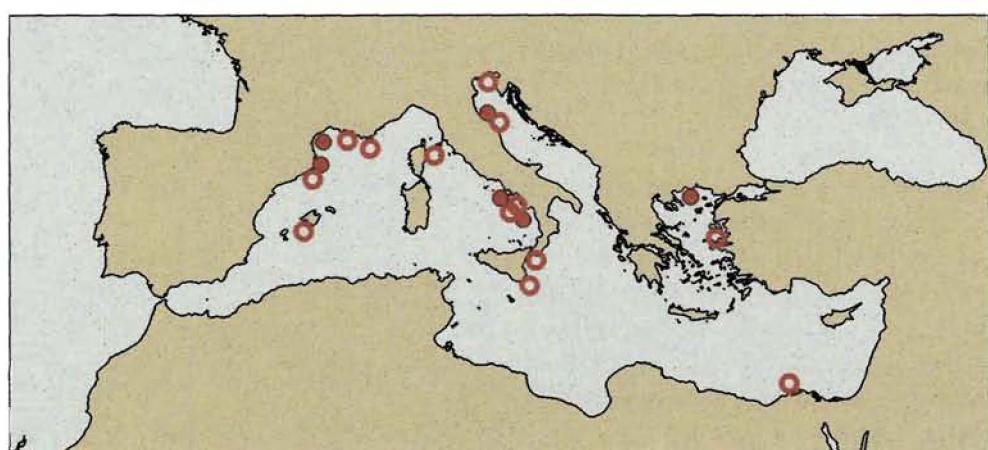
Parmi les différentes classes de microalgues constituant le phytoplancton marin, celle des dinophycées (dinoflagellés) se caractéris-

se extérieurement par deux flagelles logés dans des sillons orthogonaux et, chez certains genres, par la présence d'une enveloppe cellulosa plus ou moins épaisse. Cette dernière, appelée « thèque », se présente à l'examen microscopique comme un ensemble de plaques dont le nombre, la forme et l'agencement (tabulation) permettent de déterminer l'espèce. Dans le cas de l'*Alexandrium* de l'étang de Thau, les plaques de la thèque paraissaient correspondre à l'espèce *A. tamarensense* (fig. 2).

Toutefois, le pore de la plaque ventrale, élément important pour la diagnose des *Alexandrium*, n'était parfaitement visible que sur certaines thèques. Sa facilité d'observation est généralement fonction de son degré d'indentation sur cette plaque. En effet, localisé sur la ligne de suture entre la « ventrale » et la plaque voisine (quatrième apicale), il indente peu, voire pas du tout, la plaque ventrale (Balech, 1995). Il peut donc facilement être omis, d'où la position de certains taxonomistes qui considèrent que l'absence de pore ventral ne devrait pas être considérée comme une caractéristique spécifique. Cet avis n'est pas partagé par d'autres qui fondent la discrimination entre *A. tamarensense* et *A. catenella*, par exemple, sur la présence ou l'absence de ce pore, respectivement chez la première et la deuxième espèces.

Face à ces opinions divergentes, quelques auteurs préfèrent parler d'un complexe « *Alexandrium tamarensis/catenella* », qui comprend plusieurs types morphologiques allant de la forme « tamarensioïde » à la forme « catenelloïde ». L'analyse génétique

Figure 3
Localisation des proliférations
d'*A. tamarensense* ●
et *Alexandrium* spp. ○
sur le littoral méditerranéen,
entre 1962 et 1998.



nous permettrait peut-être de savoir si l'épisode toxique de Thau était lié à la seule présence de l'espèce *Alexandrium tamarense* ou à celle conjuguée d'*A. tamarense* et *A. catenella*.

Généralités sur *A. tamarense*. Les autres *Alexandrium* signalés en Méditerranée

Alexandrium tamarense est connu de longue date pour sa propriété à contaminer les coquillages filtreurs et à représenter ainsi un danger pour le consommateur de fruits de mer : des cas d'intoxication paralysante après consommation de moules sont décrits dès 1888 à Liverpool. Des symptômes similaires (PSP) affectent 78 personnes en 1968 sur la côte nord-est de l'Angleterre, alors que seulement une dizaine de cas avaient été recensés depuis 1888. *A. tamarense* (à l'époque *Gonyaulax tamarensis*) était déjà identifié en 1963 comme l'espèce responsable de contamination PSP au Canada et en Norvège.

En fait, *A. tamarense* a été associé à des contaminations PSP de coquillages et à des intoxications humaines dans plusieurs pays limitrophes des côtes de l'Atlantique Nord (États-Unis, Canada), de l'Atlantique Sud (Vénézuela, Uruguay, Argentine), de la mer du Nord (Angleterre, Norvège, Danemark) et du Pacifique (Japon, Corée du Sud, Taïwan). Si les coquillages filtreurs le plus souvent contaminés sont les moules, on cite également les huîtres, les palourdes, les pétoncles et les coquilles Saint-Jacques, les coques, les myes, les spisules, etc., mais aussi plusieurs prédateurs de bivalves (crustacés et oiseaux marins) et, enfin, quelques poissons tels que maquereaux et salmonidés.

Jusqu'à ces derniers événements, le littoral méditerranéen paraissait globalement épargné par ce type de manifestation (fig. 3). Pourtant, *A. tamarense* avait été signalé en Italie, en particulier en Adriatique (côtes d'Émilie-Romagne) et dans les golfs de Naples et Salerne (sud de la mer Tyrrhénienne). En fait, *A. tamarense* est observé

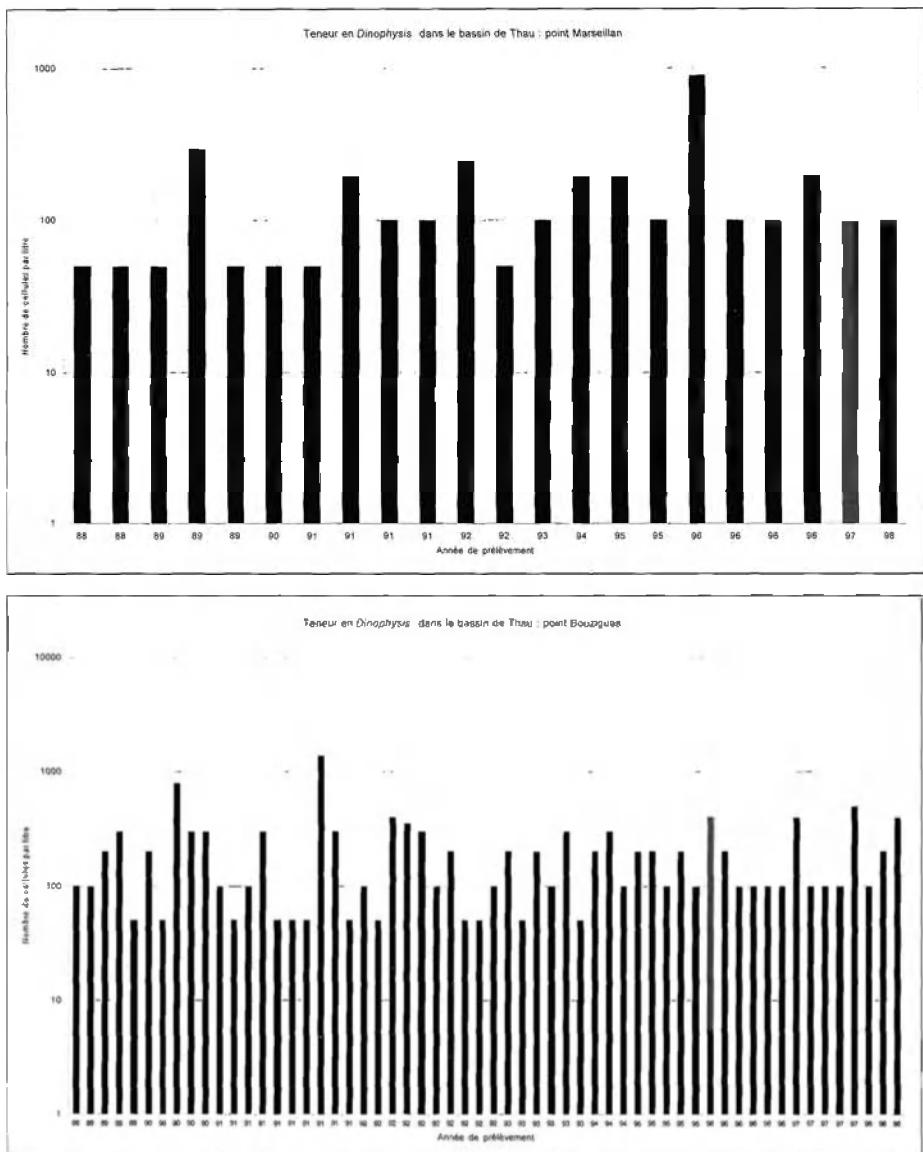


Figure 4
Concentrations en *Dinophysis* spp. entre 1988 et 1998 dans le bassin de Thau, aux points de prélèvement « Marseillan » (en haut) et « Bouzigues » (en bas).

pour la première fois dans cette zone en 1982, lors d'un bloom à 10 millions de cellules par litre sur la côte d'Émilie-Romagne, à Cervia. Les test PSP sur les coquillages sont alors négatifs. La même espèce prolifère à nouveau dans la même zone en 1985, ce qui permet de l'isoler pour la mettre en culture (Boni *et al.*, 1986). La culture se révélera non toxique et cette espèce sera détectée par la suite de façon répétée dans cette même zone, mais sans cas de PSP.

Une prolifération très dense (4 millions de cellules par litre) d'*A. tamarensis* est observée dans la lagune de Ca Pisani (Rovigo), toujours en Italie, en 1993. La cause présumée est l'eutrophisation liée à une aquaculture intensive (poissons). Le bloom provoque l'anoxie du milieu, des mortalités de macrophytes et le relargage de matières organiques.

En Espagne (côte catalane), *A. tamarensis* est signalé dans ses listes floristiques entre 1962 et 1967, mais sans mention de proliférations exceptionnelles. Enfin, en Grèce, Gortsas-Skretas signale une eau colorée à *Alexandrium tamarensis* en 1986.

Les autres espèces d'*Alexandrium* ayant provoqué des proliférations, toxiques ou non, en Méditerranée occidentale ou orientale sont essentiellement : *A. minutum* (France, Espagne,

Italie, Turquie, Égypte), *A. taylori* (Espagne, Baléares, Sicile), *A. balechii* (Italie) et *A. insuetum* (France).

En terme de présence de toxines paralytiques dans les coquillages méditerranéens, on peut noter que des blooms toxiques sont observés dès 1978, puis en 1985 et 1988 sur la côte méditerranéenne du Maroc. En 1994, des intoxications alimentaires de type PSP sont signalées et liées de façon indubitable à une prolifération de *Gymnodinium catenatum* (Jouette, 1998). En ce qui concerne les contaminations PSP liées à des proliférations d'*Alexandrium*, la première mention concerne l'Émilie-Romagne en 1994 (*A. minutum*). Ce phénomène isolé ne se reproduira pas en 1995 et 1996. Un bloom toxique d'*A. minutum* est également observé, en 1995, au niveau des îles Baléares.

Ces données, ainsi que l'épisode PSP enregistré à Thau en novembre et décembre 1998, confirment les résultats expérimentaux qui avaient été obtenus par l'Istrem à partir de cultures de différentes espèces d'*Alexandrium* : 1) il existe des souches non toxiques d'*A. tamarensis*; 2) les différences de toxicité entre espèces d'*Alexandrium* entraînent des comportements alimentaires différents pour une même espèce de coquillage : lors des proliférations d'*A. minutum*, espèce faiblement toxique, en Bretagne Nord, moules et huîtres étaient contaminées de

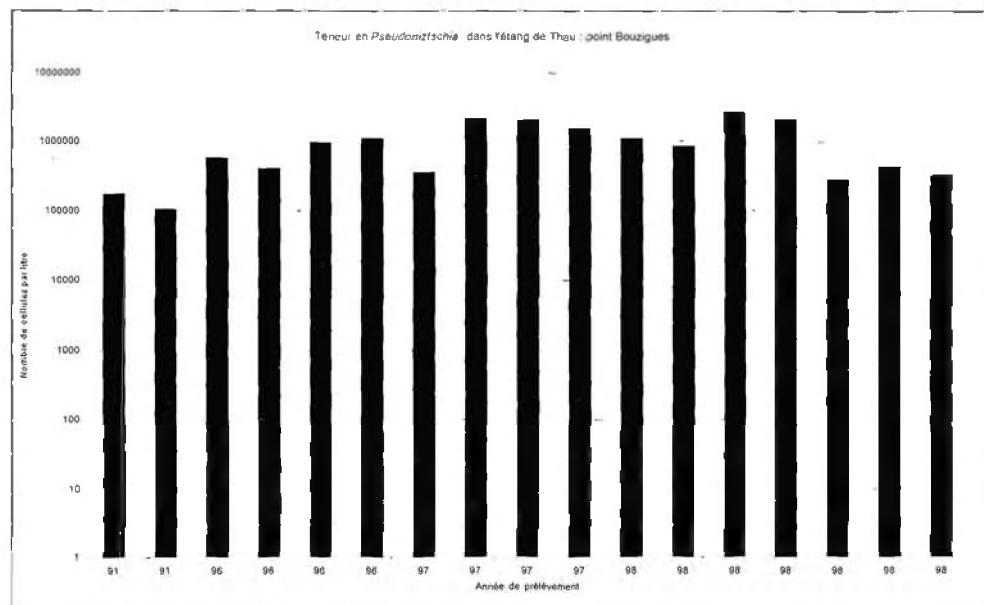


Figure 5
Concentrations en *Pseudo-nitzschia* spp. entre 1991 et 1998 dans le bassin de Thau, au point de prélèvement « Bouzigues ».

façon à peu près équivalente sur une même zone. Dans le cas d'*A. tamarensense* (espèce très毒ique) à Thau, les moules et les huîtres ont montré des valeurs maximales de toxicité extrêmement différentes, puisque les premières sont restées deux mois à des teneurs supérieures au seuil de salubrité alors que les secondes n'ont jamais dépassé ce seuil. Ce phénomène, reproductible en laboratoire, est habituellement interprété comme étant dû à une sensibilité plus grande des huîtres au contenu en toxine des microalgues, entraînant des inhibitions partielles des activités de filtration.

Les contaminations par phyco-toxines à Thau avant 1998

Ces dix dernières années, l'étang de Thau a été relativement épargné par les épisodes de toxicité liés aux phyco-toxines. En effet, la présence régulière d'espèces de *Dinophysis* dans l'étang ne s'est jamais traduite par une toxicité des coquillages, et ce malgré une teneur dépassant parfois 1 000 cellules par litre.

La figure 4 reflète les épisodes d'apparition de *Dinophysis* dans l'étang de Thau et leur intensité.

Par contre, des contaminations par des toxines DSP liées à la présence de *Dinophysis* ont été observées sur les zones de filières en mer (notamment Les Aresquiers et Marseillan) situées en face de Thau en 1987, 1989, 1990 et 1991. Ces contaminations ont entraîné des périodes de fermeture de ces zones pendant un à deux mois.

En 1985, des mortalités importantes de moules ont été observées dans l'étang concomitamment au développement de *Gyrodinium spirale* (dinoflagellé). Cependant, la toxicité de cette espèce n'a jamais été démontrée et les mortalités correspondaient aussi à une brusque chute de la température de l'eau.

La présence d'*Alexandrium tamarensense* dans l'étang de Thau n'a été confirmée qu'en 1995 (20 000 cellules par litre). Par la suite, et jusqu'en octobre 1998, cette espèce n'a

plus été observée. *Alexandrium minutum*, quant à lui, a été signalé en 1994 sur le point Bouzigues à des teneurs comprises entre 1 000 et 2 000 cellules par litre.

Depuis le début de l'année 1999, une nouvelle surveillance a été mise en place pour suivre une éventuelle apparition de toxine ASP (Amnesic Shellfish Poisons), liée à une espèce toxique de *Pseudo-nitzschia* (diatomée pennée). Ces dernières années, on a assisté régulièrement à des efflorescences de *Pseudo-nitzschia* dans l'étang de Thau.

La figure 5 récapitule uniquement les efflorescences à *Pseudo-nitzschia* supérieures à 100 000 cellules par litre au point Bouzigues.

Au point Marseillan, et pour la même période, on observe seulement un épisode en mai 1998 à 150 000 *Pseudo-nitzschia* par litre.

Chapitre II

Les méthodes utilisées par le Réphy

Les méthodes utilisées par le Réphy

Analyses planctoniques et tests de toxicité

Le Réphy assure une surveillance des deux compartiments, eau et coquillages : prélèvements d'eau pour l'observation des espèces phytoplanctoniques, en particulier les espèces toxiques et nuisibles, et prélèvements de coquillages pour le suivi des phycotoxines dans les produits destinés à la consommation.

C'est l'apparition d'une espèce toxique dans l'eau qui détermine le déclenchement de tests de toxicité sur les coquillages, ce qui permet l'économie d'une évaluation permanente et *a priori* de la toxicité dans les coquillages. Des prélèvements d'eau sont effectués régulièrement toute l'année sur l'ensemble du littoral. Quand une espèce phytoplanctonique toxique est observée, la surveillance est renforcée : activation de points de prélèvement supplémentaires (eau et coquillages), augmentation des fréquences de prélèvement. La fréquence de prélèvement est d'une fois par quinzaine en période normale (prélèvement d'eau seulement) et d'une fois par semaine dans les zones à risque et en période de risque (prélèvements d'eau et de coquillages). Les zones à risque sont celles qui ont déjà été touchées par des épisodes toxiques ; la période de risque est variable selon les régions.

Les observations phytoplanctoniques sont effectuées au microscope inversé selon la méthode d'Utermöhl (1958), après décantation des échantillons d'eau sur une cuve. L'identification des espèces se fait sur des échantillons vivants et/ou fixés au lugol, la quantification est réalisée sur les échantillons fixés. Les résultats sont donnés en concentration, c'est-à-dire en nombre de cellules par litre d'eau.

Les tests de toxicité utilisés en contrôle de routine diffèrent - selon les toxines recherchées - essentiellement par le protocole d'extraction à partir des chairs des mollusques contaminés. Les détails méthodologiques seront donnés plus loin.

Le niveau de toxicité PSP est évalué à l'aide d'un test sur souris standardisé (AOAC, 1990). Un extrait de chair totale de coquillages est injecté à au moins trois souris. Les souris sont observées pendant une heure et le temps de survie médian sert à calculer le nombre d'unités souris, qui sera lui-même converti en microgrammes d'équivalent saxitoxine par 100 g de chair. Cette valeur est comparée au seuil de la santé publique qui est de 80 microgrammes. Si le résultat trouvé est :

- supérieur ou égal à 80 µg, les coquillages contiennent des toxines PSP en quantité dangereuse pour les consommateurs ;
- compris entre 38,5 µg (le seuil de détection de la méthode) et 80 µg, les coquillages sont considérés comme non dangereux malgré la présence de toxines ; celles-ci étant en quantité inférieure au seuil de salubrité.

Le niveau de toxicité DSP est évalué à l'aide d'un autre test sur souris (Belin *et al.*, 1996). Un extrait de glandes digestives de coquillages est injecté à trois souris. Celles-ci sont observées pendant 24 heures ; le critère de positivité (ou de salubrité) retenu par l'Ifremer, en accord avec l'administration compétente, est un temps moyen de survie des souris inférieur à 5 heures (Marrailou-Le Baut *et al.*, 1985). Si le temps de survie moyen est :

- inférieur ou égal à 5 heures, les coquillages contiennent des toxines DSP en quantité dangereuse pour les consommateurs ;
- compris entre 5 et 24 heures, les coquillages sont considérés comme commercialisables, malgré la présence de toxines ; celles-ci étant en quantité inférieure à 2 µg/g de glande digestive.

La structure opérationnelle du Réphy reposant sur douze laboratoires côtiers répartis

sur l'ensemble du littoral français, les prélevements, observations et analyses sont réalisés par chaque laboratoire pour la portion de littoral qui le concerne. La cohérence de l'ensemble nécessite un effort permanent d'harmonisation, qui s'est récemment concrétisé par une démarche d'assurance qualité (voir annexe). Le plan qualité Réphy, dont un modèle général a été rédigé en 1998, est actuellement en cours de finalisation dans chacun des laboratoires côtiers. Le chapitre traitant des analyses, en particulier, a pour but de décrire l'ensemble des actions liées à la prise en compte des échantillons et des analyses, du prélèvement à la gestion des résultats. Il contient également la liste des documents de référence décrivant les procédures à suivre et les méthodes à utiliser.

Évolution des méthodes et analyses de confirmation

Sur les côtes françaises métropolitaines, deux familles de phycotoxines ont présenté jusqu'à aujourd'hui un danger pour les consommateurs. Il s'agit des toxines diarrhéiques (acide okadaïque et ses dérivés) et des toxines paralysantes (saxitoxine et ses dérivés). Ces toxines sont produites respectivement par des dinoflagellés du genre *Dinophysis* et *Alexandrium* (Sournia *et al.*, 1991).

L'acide okadaïque agit au niveau cellulaire en inhibant les protéines-phosphatasées (PP), enzymes provoquant la déphosphorylation des protéines phosphorylées par les protéines-kinases. Il se produit donc une accumulation des protéines phosphorylées donnant lieu à différents effets biologiques indésirables : promotion tumorale, transformation de la morphologie des cellules, contracture des muscles lisses, etc.

La saxitoxine, elle, agit directement sur les mécanismes de transmission des influx nerveux en bloquant la perméabilité des cellules nerveuses et musculaires aux ions sodium. Cet effet se traduit par des symptômes neurologiques, dont le plus frappant est la paralysie des muscles respiratoires.

Le point commun entre ces toxines est la complexité des molécules impliquées dans la

toxicité des coquillages. En effet, dans chaque cas, l'agent toxique responsable n'est pas une seule substance mais une famille de dérivés dont la toxicité s'évalue par rapport à celle de la molécule de base (acide okadaïque/saxitoxine). De plus, ces dérivés peuvent faire l'objet de réactions biochimiques d'interconversion, principalement dans les coquillages et probablement également dans le tube digestif de l'homme également.

Le profil toxinique complexe de chaque famille de toxines continue de poser des difficultés pour la mise au point de méthodes appropriées de détection et de quantification des différentes phycotoxines dans les coquillages.

Dans le cadre de la surveillance des coquillages, le contrôle de la salubrité passe d'abord par une extraction des toxines avec un solvant approprié, à partir d'une matrice généralement très riche en protéines, lipides et polysaccharides. La procédure d'extraction diffère en fonction des propriétés chimiques de chaque famille de toxines : les PSP sont solubles dans les solvants polaires (eau, méthanol...) et les DSP dans les solvants organiques moyennement polaires (dichlorométhane, chloroforme...). Les extraits obtenus sont prêts à être testés selon les techniques de dépistage des toxines recherchées.

Les méthodes de détection des toxines dans les extraits de coquillages varient en fonction de la sensibilité, de la spécificité, de la rapidité, du coût d'analyse... Actuellement, il existe deux types de méthodes adoptées par la plupart des pays : un test biologique sur souris, qui met en évidence une toxicité globale du coquillage, et l'analyse physico-chimique, qui permet d'identifier et de quantifier les phycotoxines impliquées. Néanmoins, cette dernière méthode nécessite une étape préalable de purification de l'extrait de dénaturation des coquillages.

Les tests biologiques sur souris utilisés pour la surveillance des DSP/PSP

La procédure utilisée pour les toxines PSP est validée au niveau international comme méthode de référence AOAC (Association of Official Analytical Chemists, 1990). Elle

consiste en une extraction acide de la chair totale du coquillage suivie d'une injection par voie intrapéritonéale à des souris de l'équivalent de 0,5 g de chair (1 ml de solution). Les temps de survie médians des souris et les symptômes neurologiques sont corrélés avec la quantité de toxines présente dans l'extrait de coquillage. La limite de détection est de 38,5 µg équivalent saxitoxine par 100 g de chair alors que le seuil de salubrité pour les consommateurs est fixé à 80 µg équivalent STX par 100 g de chair.

Cette procédure est relativement simple à réaliser et à interpréter. Cependant, pour être en conformité avec les exigences propres à l'expérimentation animale, elle nécessite des locaux adaptés et conformes à la réglementation. De plus, le test ne fournit aucune information sur la variété des toxines paralysantes présentes dans l'extrait.

Concernant les toxines DSP (acide okadaïque et dérivés, pecténotoxines, yessotoxines), un test de toxicité aiguë sur souris a été également développé pour leur dépistage à partir des glandes digestives (GD) des coquillages (Yasumoto *et al.*, 1978 ; 1984). L'extraction de ces toxines est réalisée avec des solvants organiques (acétone, dichlorométhane). On injecte ensuite à des souris l'équivalent de 5 g de GD repris dans un solvant approprié (1 ml). Dans l'adaptation du test réalisé par l'Ifremer en 1985, les coquillages sont considérés comme imprévisibles à la consommation si le temps de survie moyen des souris est inférieur ou égal à cinq heures, ce qui correspond à une teneur en DSP de 2 à 4 µg d'acide okadaïque par gramme de GD, dans le cas d'une contamination exclusive à l'acide okadaïque.

Contrairement au test PSP sur souris, la technique de dépistage des DSP (toxines diarrhéiques, yessotoxines et pecténotoxines) sur souris n'est pas normalisée AOAC et n'est pas spécifique. En fait, l'effet des DSP chez la souris ne se traduit pas par des symptômes caractéristiques et il est donc difficile à interpréter. Ce manque de spécificité peut conduire à des problèmes d'interférences avec des substances non toxiques pour l'homme ou avec d'autres toxines connues.

Que ce soit pour les DSP ou pour les PSP, en cas de doute sur la nature des toxines en cause, une expertise utilisant les méthodes physicochimiques est menée afin d'identifier certaines des toxines impliquées.

Les méthodes physicochimiques DSP/PSP

Les méthodes physicochimiques (CLHP-FL et CLHP-SM) sont complexes et délicates ; elles exigent un matériel coûteux, ne peuvent être réalisées que par des personnels spécialisés et ne sont pas utilisables partout en contrôle de routine. Elles sont utilisées essentiellement dans le cadre de la recherche.

CLHP couplée à un spectrofluorimètre (CLHP-FL)

La séparation des toxines de la famille des PSP utilise une chromatographie liquide d'appariement d'ions dont le principe est fonction à la fois de la charge et de la polarité des différentes toxines. Comme ces dernières ne présentent pas de propriété spectrométrique, elles subissent une oxydation en sortie de colonne chromatographique, donnant ainsi des produits dérivés fluorescents et donc détectables par un spectrofluorimètre. Ce couplage CLHP-déivation permet de quantifier séparément la plupart des phycotoxines paralysantes, avec une limite de détection de la toxicité globale de 5 µg équivalent STX par 100 g de chair. Néanmoins, cette technique est lourde à mettre en œuvre et l'inconvénient majeur est l'indisponibilité de toutes les toxines standard certifiées permettant de doser avec précision chaque dérivé de la saxitoxine.

Une méthode d'analyse chimique a été également développée pour le dosage des toxines diarrhéiques par CLHP. Elle consiste en une séparation par chromatographie liquide avec une détection par fluorimétrie après dérivation de l'acide okadaïque (AO) avec un agent fluorescent. Le seuil de détection est 0,4 µg d'AO par gramme de glande digestive, ce qui est compatible avec la limite de contamination acceptable (0,8 à 2 µg AO/g selon les pays). Cette méthode permet de quantifier précisément les teneurs en acide okadaïque et un

de ses dérivés, la dinophysistoxine-1 (DTX-1). Elle a l'avantage d'être spécifique, sensible, mais elle est longue à mettre en œuvre puisqu'une étape de purification des toxines dérivées est nécessaire avant l'analyse chromatographique.

CLHP couplée à un spectromètre de masse (CLHP-SM)

L'analyse chimique par CLHP couplée à un spectrofluorimètre peut être limitée pour certaines phycotoxines. À titre d'exemple, les nouvelles phycotoxines diarrhéiques récemment identifiées (DTX-2, DTX-3, DTX-4, DTX-5 et les diolesters de l'acide okadaïque) ne peuvent pas être dosées par cette technique. Devant le nombre croissant de rapports signalant la présence de ces phycotoxines et du fait du risque qu'elles représentent, le laboratoire communautaire de référence de Vigo recommande de les rechercher systématiquement. Cette recherche passe par des moyens plus performants, comme la spectrométrie de masse couplée à la CLHP⁽¹⁾.

Problèmes posés par le test de dépistage des DSP sur souris

La méthode de dépistage des DSP (toxines diarrhéiques, yessotoxines et pecténotoxines) sur souris, à partir des extraits acétонiques de coquillages, est pratiquée dans différents pays et elle est de plus en plus critiquée, à la fois pour des raisons d'éthique (essais sur animaux vivants) et pour sa faible spécificité (Draisci *et al.*, 1994), car il a été montré qu'elle peut prendre en compte les PSP et les acides gras libres (Takagi *et al.*, 1984 ; Kogawa *et al.*, 1989). En effet, l'extraction acétonique met en évidence une toxicité globale des extraits de coquillages en permettant d'extraire une gamme très large de substances, dont certaines peuvent interférer et conduire à des « faux positifs ».

Comme on l'a vu, d'autres interférences peuvent être dues à des toxines connues ou inconnues, ce qui peut être considéré comme un avantage. Mais l'extraction acétonique peut également être un inconvénient lorsque des toxines PSP présentes en

quantité inférieure au seuil de salubrité interfèrent avec le test.

Ce type d'interférence se produit depuis 1994 à Toulon et à Arcachon lorsqu'on pratique des tests sur souris en hiver, selon la méthode de dépistage des DSP. Dans les deux cas, les toxines paralysantes (GTX) identifiées dans les fractions purifiées à partir des glandes digestives sont toujours inférieures au seuil de salubrité (80 µg équivalent saxitoxine par 100 g chair).

C'est pourquoi l'Ifremer a mis en place depuis 1994 (Belin *et al.*, 1996), dans le cadre du Réphy, un protocole d'extraction (hexane/dichlorométhane/méthanol-eau) à partir des glandes digestives qui permet de séparer les différentes substances en fonction de leur polarité. Les tests de dépistage des DSP sur souris sont ensuite pratiqués à partir de la fraction dichlorométhane qui contient les toxines de type DSP (AO et dérivés, YTX, PTX et azaspiracides).

Un autre phénomène de forte toxicité des coquillages impliquant l'interférence des PSP dans le test de dépistage des DSP s'est également produit lors de l'épisode 1998 de l'étang de Thau. En effet, dans le cadre des contrôles de routine pratiqués par les services vétérinaires à partir des coquillages prélevés dans les établissements conchylicoles, les tests DSP « acétone » sur souris se sont révélés positifs, avec des symptômes neurologiques (voir plus loin chronologie des décisions administratives).

Si la méthode de référence internationale AOAC utilisée pour les PSP est calibrée pour la détection des phycotoxines paralyssantes, aucune technique de dépistage des DSP ou toxines diarrhéiques n'est validée par une étude interlaboratoire. La méthode actuelle est fondée sur la détection d'une toxicité globale des coquillages et peut donc induire les problèmes d'interférences précités. C'est pourquoi les études s'orientent vers la mise au point de méthodes alternatives qui soient à la fois spécifiques, sensibles et rapides.

(1) L'Ifremer et l'université de Nantes ont fait l'acquisition, en 1997, d'une CLHP-SM destinée à évaluer la présence de nouvelles phycotoxines ou de nouveaux dérivés de phycotoxines connues.

Méthodes proposées pour remplacer le test DSP sur souris

Bien que le test sur souris soit simple à pratiquer et permettre d'évaluer une toxicité globale des coquillages liée ou non aux phycotoxines, cette technique pourrait être progressivement abandonnée si d'autres tests ou éventails de tests permettent de garantir un niveau de sécurité sanitaire équivalent.

La recherche de méthodes spécifiques à certaines molécules a conduit au développement et à l'exploitation des tests *in vitro* (culture cellulaire, réaction enzymatique...). En effet, la faisabilité de ces tests est aujourd'hui rendue possible grâce à la maîtrise de la culture cellulaire et à l'apparition d'outils biologiques de pointe pour la mesure de la toxicité *in vitro*.

Ainsi, récemment, un test toxicologique spécifique des PSP a été développé par les Canadiens. Il utilise une culture de neuroblastomes de souris. Ce test est fondé sur le mode d'action des toxines paralysantes, qui agissent directement sur les mécanismes de transmission des influx nerveux en bloquant la perméabilité des cellules nerveuses aux ions sodium. Il a été comparé à l'essai biologique sur souris et fait l'objet actuellement d'une étude de validation internationale⁽²⁾.

Concernant les toxines diarrhéiques, deux tests *in vitro* sont en cours de mise au point ou de prévalidation⁽²⁾. Ils se fondent sur l'exploitation directe ou indirecte de l'effet inhibiteur de l'acide okadaïque sur les protéines-phosphatasées (PP1 et PP2A). Le premier utilise un extrait de PP2A, et l'effet inhibiteur direct de l'AO, des DTX-1 et DTX-2 est évalué par un dosage colorimétrique. Le deuxième test utilise une suspension de culture cellulaire sur laquelle l'effet toxique de l'AO se traduit par une modification de la morphologie des cellules en inhibant les PP2A du cytosquelette. Ces tests possèdent les critères de spécificité, de sensibilité et de rapidité nécessaires sans utiliser des animaux

vivants. Ils sont également bien corrélés avec le test de toxicité aiguë sur souris et avec le dosage chimique par CLHP (Amzil *et al.*, 1992 ; Marcaillou-Le Baut *et al.*, 1994 ; Honkanen *et al.*, 1996).

Plusieurs tentatives sont également effectuées pour développer des systèmes d'analyse immunologique de ces phycotoxines (Frémy *et al.*, 1994).

De même, un test immunoenzymatique a été mis au point par une équipe allemande pour la détection de la saxitoxine (PSP) ; il est actuellement commercialisé sous forme d'un kit (Ridascreen, R-Biopharm). À la suite d'une étude d'intercalibration organisée par le Bureau communautaire de référence (BCR), l'étude comparative avec l'analyse physicochimique a montré que ce test conduisait à une surestimation de la saxitoxine. De ce fait, cette technique est actuellement pratiquée pour une mesure semi-quantitative des PSP. Néanmoins, lors de la contamination PSP des coquillages dans l'étang de Thau, cette technique a été utilisée, à la demande des conchyliculteurs, par le laboratoire privé Ecobiolab, à Sète. Les résultats obtenus ont montré une grande cohérence avec ceux de l'Ifremer.

Concernant les DSP, plusieurs tests immunologiques ont été développés pour la détection de l'acide okadaïque mais ils n'ont pas été validés à cause des problèmes d'interférence avec d'autres toxines marines ayant des structures moléculaires voisines (maitotoxine, palytoxine, breveroxine...). Récemment, un kit Elisa a été commercialisé, utilisant un anticorps monoclonal anti-acide okadaïque. Il est beaucoup plus sensible à l'acide okadaïque qu'à ses dérivés (DTX-1, DTX-2) et insensible au dérivé DTX-3, ce qui peut conduire à une sous-estimation de la toxicité globale des coquillages contenant ces dérivés. De plus, cette technique présente un coût très élevé, surtout pour le traitement de nombreux échantillons dans le cadre d'un réseau de contrôle comme le Réphy.

(2) Ces tests « alternatifs » sont actuellement comparés et évalués par l'Ifremer-Nantes.

Pour le moment, parmi les méthodes proposées, aucune n'est validée AOAC au niveau international pour le dépistage des phycotoxines en contrôle de routine. Néanmoins, la recherche de nouvelles méthodes et l'amélioration des techniques existantes sont poursuivies actuellement dans plusieurs pays, dont la France.

La réglementation

Le décret 84-428 du 5 juin 1984 prévoit que l'Ifremer « apporte à l'Etat et aux autres personnes morales de droit public son concours pour l'exercice de leurs responsabilités, notamment pour le contrôle de la qualité des produits de la mer et du milieu marin ».

C'est dans ce cadre, et parce que la salubrité des coquillages est étroitement dépendante de la qualité des eaux de récolte ou de cueillette, que l'Ifremer, pour remplir sa mission, a développé notamment son réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines, le Réphy.

En effet, une surveillance de la salubrité des coquillages exercée seulement en aval de la filière de production (mise sur le marché, exposition à la vente) a, chez nous, toujours été considérée comme devant être complétée par une surveillance du milieu pour une couverture satisfaisante du risque sanitaire. Les experts de la protection de la santé des consommateurs préconisent justement une stratégie de double surveillance à deux volets complémentaires. Cette philosophie a d'ailleurs été adoptée par l'Europe, avec la publication de la directive 91/492 du 15 juillet 1991 relative aux conditions de production et de mise en marché des mollusques bivalves vivants, qui prévoit :

- un contrôle sanitaire effectué lors de la mise en vente des mollusques bivalves (*cf. art.3, pt.1f*) ;
- une surveillance des zones de production et de repartage effectuée sous la responsabilité de l'autorité compétente et fondée sur des analyses de coquillages et des suivis de populations phytoplanctoniques.

Le réseau de surveillance Réphy répond à cette dernière exigence, à la demande du ministère de l'Agriculture et de la Pêche et au profit de l'ensemble des ministères techniques concernés, dont le ministère de l'Emploi et de la Solidarité, chargé de la Santé. Cette surveillance du milieu qui, dans les faits, concerne les coquillages en tant que « matière première » est complétée par les plans de surveillance développés par les services de la Direction générale de l'alimentation (Dgal), lesquels veillent à la qualité sanitaire des coquillages en tant que « denrée alimentaire ».

Les méthodes mises en œuvre dans le cadre des actions précitées, ainsi qu'en matière d'autocontrôle à la charge des opérateurs commerciaux, nécessitent une harmonisation au plan national et au niveau de l'Union européenne.

En France, l'unité « toxines microbiennes » du laboratoire central d'hygiène alimentaire a été désignée comme laboratoire national de référence (LNR) pour le contrôle des biotoxines marines par décision 93/383/CEE du 14 juin 1993 (modifiée par décision 99/312/CEE du 29 avril 1999). Ce laboratoire du Centre national d'études vétérinaires et alimentaires (Cneva) a été intégré, comme l'ensemble du Cneva, dans l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) depuis le 30 mars 1999. Cette même décision 93/383/CEE désigne le laboratoire du ministère espagnol de la Santé et de la Consommation à Vigo comme laboratoire communautaire de référence (LCR), lequel est actuellement le laboratoire des biotoxines marines de la circonscription sanitaire de Vigo (station maritime s/n E-36271 Vigo).

Le LCR a pour mission d'assister aux plans scientifique et technique les LNR pour concourir à la mise au point et à l'adoption de méthodes harmonisées. Il participe à la formation des LNR, coordonne leurs activités au niveau communautaire et organise des essais comparatifs entre les Etats membres. Il fournit également une assistance technique et scientifique aux services de la Commission.

Au sein de chaque État membre, le LNR répond aux demandes d'informations scientifiques et techniques des laboratoires et des organismes impliqués dans la surveillance ainsi que des laboratoires privés œuvrant, le cas échéant, dans le cadre des autocontrôles.

Lors des deux dernières réunions organisées par le LCR, les questions relatives aux méthodes à mettre en œuvre pour la recherche des toxines de type DSP ont été largement évoquées et les participants des LNR ont accepté un compromis pour que la méthode décrite par Yasumoto *et al.* (1978) - test avec extraction à l'acétone et observation des animaux pendant 24 h - soit utilisée, ce qui est déjà le cas en Autriche, en Belgique, au Luxembourg, au Danemark, en Irlande et en Espagne. En France, cette méthode est également utilisée par les laboratoires vétérinaires départementaux et l'Afssa (LNR). Le réseau Réphy de l'Ifremer met en œuvre une technique d'extraction plus sélective, avec une observation des animaux pendant 5 heures (voir *supra*). L'Italie, le Portugal et le Royaume-Uni appliquent également une extraction plus spécifique des toxines.

Le LCR recommande, depuis 1996, d'effectuer le contrôle des coquillages à l'aide du test sur souris précédé d'une extraction à l'acétone, de spectre plus large (test Yasumoto *et al.*, 1978).

Dans la perspective d'une harmonisation qui ne porterait pas préjudice à l'industrie coquillière par l'obtention de faux positifs et qui n'alourdirait pas les charges et contraintes de la surveillance par un surcoût de validation de tests peu spécifiques, l'Ifremer a suscité, dès juillet 1998, une réflexion entre la Dgal et la DPMCM du ministère de l'Agriculture et de la Pêche, le Cneva et l'Ifremer. Cette réflexion conduite dans le contexte de la crise de Thau a conduit à la préparation d'un protocole scientifique entre l'Ifremer et le Cneva. Ce protocole, adopté le 27 novembre 1998 par l'ensemble des organismes et administrations concernés, a été mis en œuvre début 1999.

L'épisode de toxicité de l'étang de Thau a permis de sensibiliser les administrations et les professionnels aux aspects méthodologiques et à la nécessaire coordination nationale.

Chapitre III

Observations réalisées en novembre 1998

Observations réalisées en novembre 1998

Chronologie des décisions administratives

- Le 6 octobre 1998, un échantillon de moules a été prélevé et adressé au laboratoire vétérinaire départemental des Bouches-du-Rhône. L'analyse de cet échantillon a permis la mise en évidence d'un composé potentiellement毒ique (test DSP « acétone » positif).
- Le 12 octobre, l'Ifremer-Sète ne détecte pas de microalgues toxiques dans les prélèvements d'eau des secteurs conchylicoles de l'étang (examens de routine du Réphy).
- Les 20 et 26 octobre, la DSV 34 trouve des résultats toujours positifs sur les moules (test DSP « acéron » positif, test PSP négatif).
- Le 26 octobre, l'Ifremer-Sète préleve des échantillons d'eau qui se révéleront contenir des cellules phytoplanctoniques du genre *Alexandrium* sp. à la concentration de 75 000 cellules par litre.
- Le 3 novembre, l'Ifremer-Sète confirme la présence d'*Alexandrium* et identifie l'espèce comme *A. tamarense*. Les concentrations observées sont de 90 000 cellules par litre à

Tableau

Recherche de toxines DSP (1) par les services vétérinaires en octobre et novembre 1998.

(1) Référence de la méthode : bioassai sur souris (Yasumoto et al., 1978). Critère de toxicité : test positif : au moins deux souris mortes sur trois en 24 heures.

Bouzigues et 22 000 cellules par litre à Marseillan. Les analyses opérées sur les coquillages de la zone contaminée confirment un test DSP « acétone » positif.

- Le 5 novembre, l'Ifremer-Sète pratique un test AOAC sur les moules qui est positif et correspond à une concentration de toxines PSP égale à 850 µg équivalent STX par 100 g de chair de bivalves soit environ dix fois le seuil de santé publique (80 µg/100 g).

La direction des Affaires maritimes de l'Hérault est immédiatement alertée par téléphone puis télécopie. Le soir même, une réunion du pôle de compétence (Affaires maritimes, DSV 34, Ddass 34, DRCCRF 34, SMNLR et Ifremer) conclut sur la nécessité d'une fermeture immédiate de la pêche, du ramassage et de l'expédition de tous les coquillages de l'étang de Thau. Le préfet prend un arrêté de fermeture le jour même à 20 heures (arrêté n° 98.1.3430). Cette mesure concerne également tous les coquillages d'autres provenances faisant l'objet d'une remise en bassin dans les « établissements d'expédition » alimentés par l'eau de l'étang.

Selon le protocole mis en application par la DSV 34, les prélèvements du département de l'Hérault ont été envoyés au laboratoire vétérinaire départemental des Bouches-du-Rhône (LVD 13). Les résultats positifs étaient confirmés par le Cneva-Paris et, dans ce cas, les services vétérinaires étaient chargés d'avertir la Ddam pour la mise en place des mesures de contrôle appropriées sur la zone de production d'origine.

| Espèce de coquillage | Dates de première mise en évidence par LVD 13 | Dates de prélèvement pour confirmation | Dates de résultat | Résultats Cneva (survie en mn) |
|----------------------|---|--|-------------------|--------------------------------|
| Huîtres | | | | |
| Loupian | 20/10/98 | 4/11/98 | 16/11/98 | < 5 mn = positif |
| Palourdes | | | | |
| Thau | 20/10/98 | 4/11/98 | 16/11/98 | < 5 mn = positif |
| Huîtres | | | | |
| Marseillan | 26/10/98 | 4/11/98 | 16/11/98 | < 5 mn = positif |
| Palourdes | | | | |
| Ingril | 26/10/98 | 4/11/98 | 16/11/98 | < 5 mn = positif |
| Palourdes | | | | |
| Thau | 26/10/98 | 4/11/98 | 16/11/98 | < 5 mn = positif |

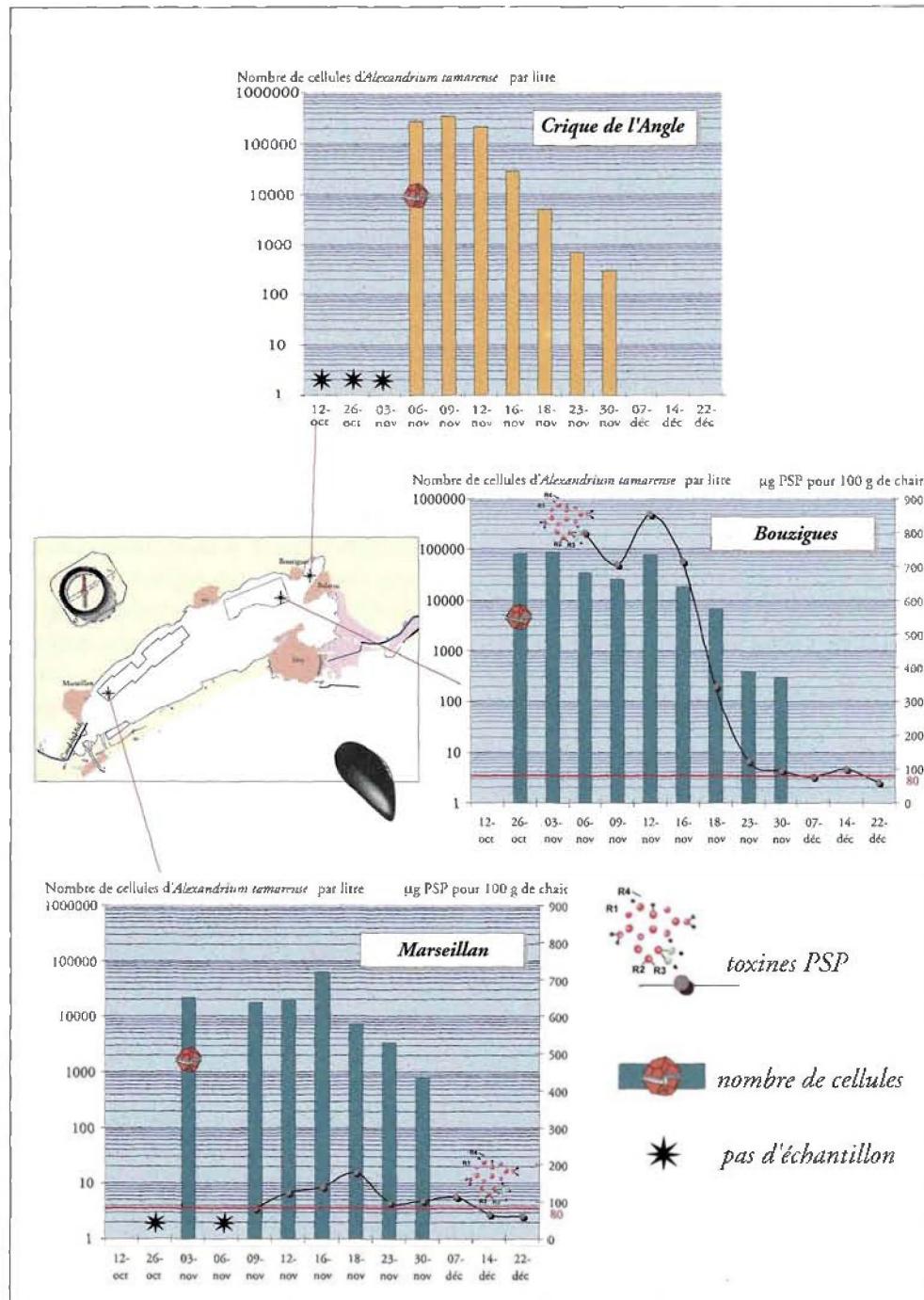


Figure 6
Évolution du nombre d'*Alexandrium tamarens*e et de la concentration en toxines PSP dans les prélèvements d'eau et de moules de la lagune de Thau.

La chronologie des tests et des résultats obtenus montre que les essais réalisés sur la glande digestive avec la méthode recommandée par le LCR pour les phycotoxines diarrhéiques (DSP) ont été positifs dès le 20 octobre (tableau). Toutefois, il a été noté que « les tests étaient positifs dans des conditions différentes de celles généralement rencontrées,

à savoir : délai de mort court (moins de 5 mn après injection) avec symptômes de type neurologique (souris nerveuses avec soubresauts précédant la mort) ».

Par la suite, le pôle de compétence s'est réuni très régulièrement pour analyser l'évolution de la situation.

Ainsi, il a proposé au préfet d'autoriser à nouveau la commercialisation des huîtres de l'étang de Thau le 27 novembre 1998. En effet, après 22 tests PSP sur souris tous négatifs (teneur en toxines inférieure au seuil réglementaire) sur cette espèce, confirmation de l'absence de risque DSP et constatation de la très forte diminution du nombre des cellules d'*Alexandrium* présentes dans l'eau, le pôle a considéré qu'il n'était plus nécessaire de maintenir l'interdiction pour les huîtres.

Le préfet a pris une décision dans ce sens (réouverture pour les huîtres uniquement) le 27 novembre 1998 à 17 h 15 (arrêté n° 98.1.3654).

Cette mesure n'a été étendue à tous les couillages que le 29 décembre 1998 (arrêté n° 98.1.4027), après deux semaines consécutives de tests PSP négatifs (< 80 µg équivalent STX par 100 g de chair) sur les moules et les palourdes.

Dès le 28 novembre 1998 (date de la réouverture partielle de l'étang), le problème du transfert des huîtres vers d'autres bassins ostréicoles a été soulevé. En effet, si l'absence de toxicité pour le consommateur était acquise, la persistance d'*Alexandrium tamarense* dans l'eau (de 200 à 1 500 cellules par litre) incitait à la prudence quant au transfert des huîtres pour retrempage (message de l'Ifremer expédié le 2 décembre 1998 à la direction des

Affaires maritimes de l'Hérault). Les connaissances actuelles montrent qu'une contamination par une espèce phytoplanctonique est possible de zone à zone lorsque cette espèce est présente dans l'eau, sans qu'il soit toutefois possible de fixer un seuil. Cependant, aucun texte réglementaire (français ou européen) ne permet d'interdire un tel transfert.

Données biologiques et toxicologiques

Identification du phénomène

Hors périodes d'alerte, le Réphy repose sur un réseau de soixante stations de prélèvements réparties sur l'ensemble du littoral. On dénombre quatre stations en Languedoc-Roussillon, dont une dans l'étang de Thau. En période hivernale, un prélèvement d'eau est effectué tous les quinze jours sur chacun de ces points afin de détecter d'éventuelles espèces productrices de phycotoxines.

Alors que les prélèvements du 12 octobre ne présentaient pas de concentrations importantes d'espèces réputées dangereuses, les examens microscopiques du prélèvement suivant (26 octobre) montraient une forte densité d'*Alexandrium* sp. à Bouzigues (75 000 cellules par litre) et, simultanément, son absence à Marseillan.

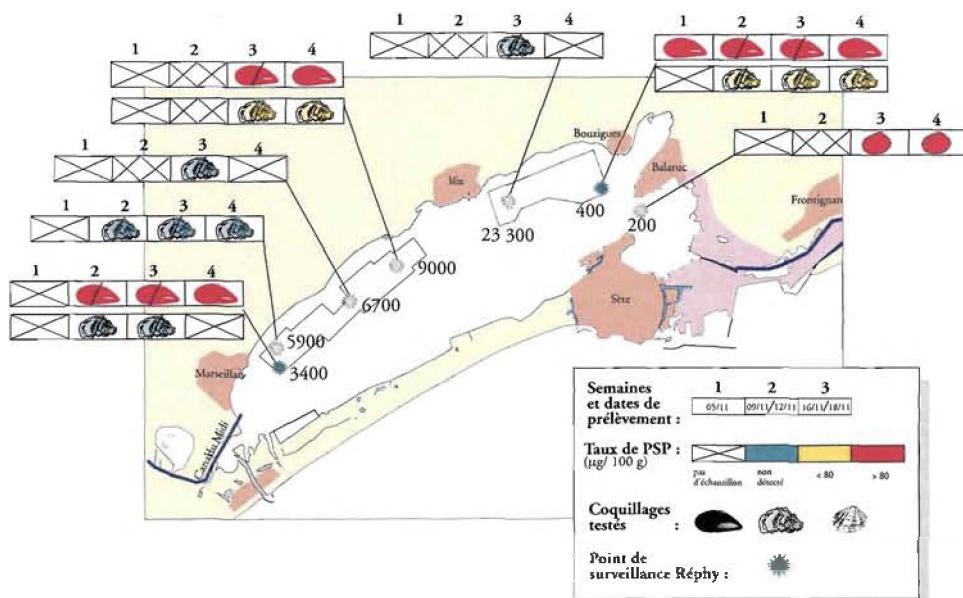


Figure 7
Évolution des biotoxines PSP (paralysantes) sur la lagune de Thau et nombre d'*Alexandrium tamarense* le 23 novembre 1998.

Dans le même temps, la DSV 34 signalait que les prélèvements de coquillages réalisés les jours précédents chez les producteurs du secteur affichaient des résultats de test DSP sur souris positifs avec symptômes neurologiques (voir plus haut).

Le 3 novembre 1998, des concentrations de 90 000 et 22 000 cellules par litre étaient relevées, respectivement sur les points de Bouzigues et Marseillan. En une semaine, le phénomène semblait donc s'être étendu à l'ensemble de la lagune.

Évolution

Bien que le réseau Réphy ait montré ses capacités à suivre l'extension du phénomène sur la lagune, les semaines suivantes, sous des pressions d'origines diverses, des prélèvements supplémentaires d'eau, de moules, de palourdes et d'huîtres ont été réalisés. Si cette crise pouvait être gérée de manière différente suivant le type de coquillages, par contre, il était déraisonnable de vouloir contrôler l'étang par secteur. Les prélèvements vont donc être effectués en divers endroits de l'étang et, dans certains cas, plusieurs fois par semaine.

Les résultats font apparaître une contamination systématique des palourdes avec des teneurs en toxines supérieures au seuil de 80 µg équivalent STX par 100 g alors que les huîtres sont toujours en dessous du seuil de salubrité (fig. 7).

Parmi les points supplémentaires échantillonnés, c'est dans la crique de l'Angle que le nombre maximum de cellules par litre d'eau sera relevé (350 000). C'est également dans ce secteur que la décroissance d'*Alexandrium* sera la plus régulière, contrairement à Bouzigues et surtout à Marseillan où une relative constance du nombre de cellules peut être observée jusqu'au 18 novembre (~ 20 000). Malgré ce nombre élevé d'*Alexandrium* sur Marseillan, la quantité de toxines relevée sur les moules de cette zone demeure plus faible avec un maximum de 317 µg de toxine pour 100 g de chair le 23 novembre.

Si une relation entre quantité de toxines dans les moules et nombre de cellules

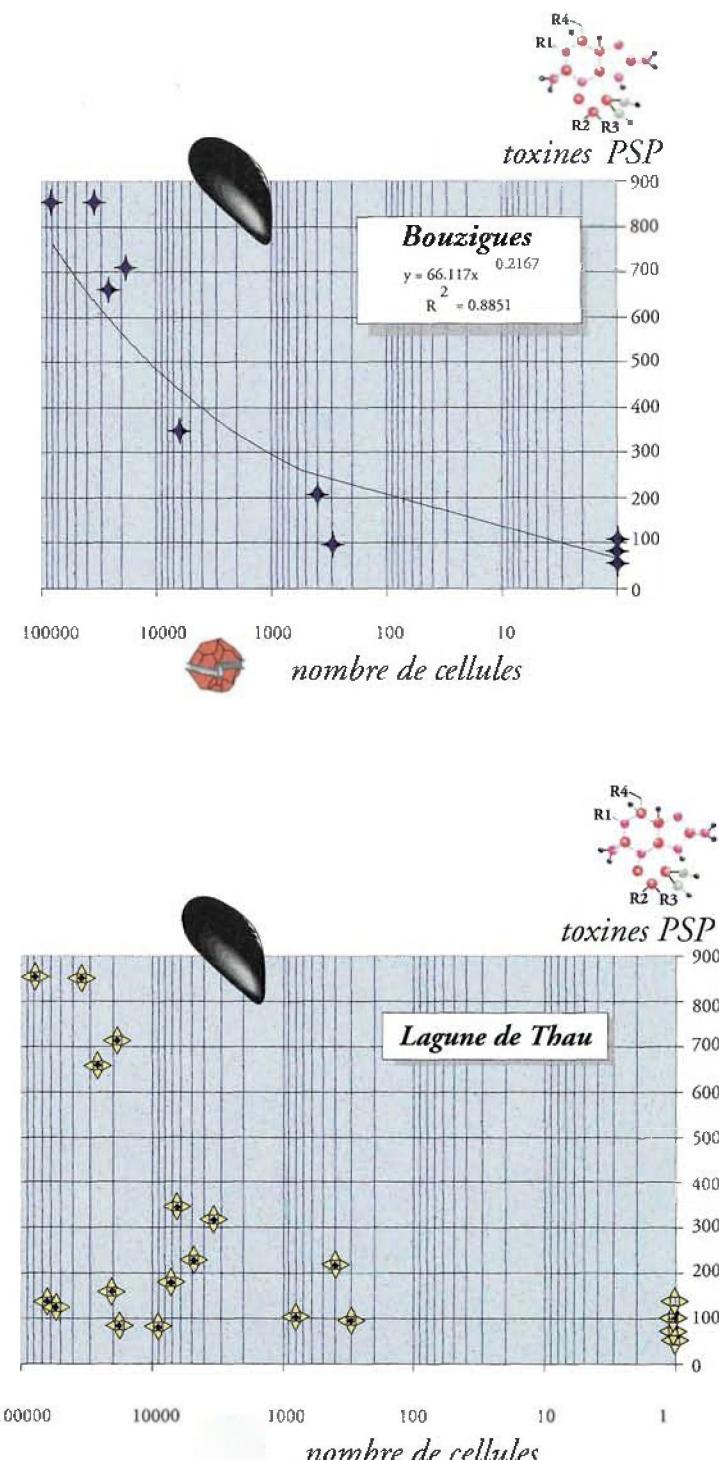
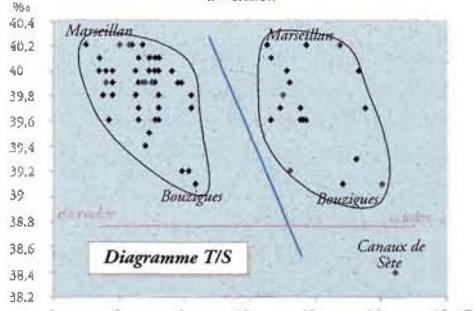
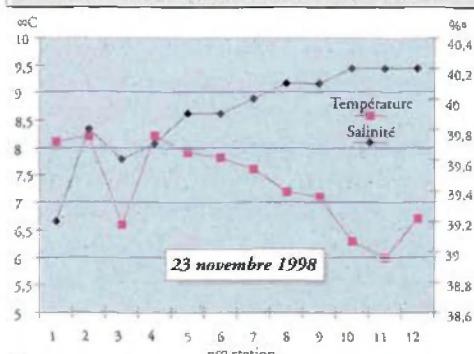
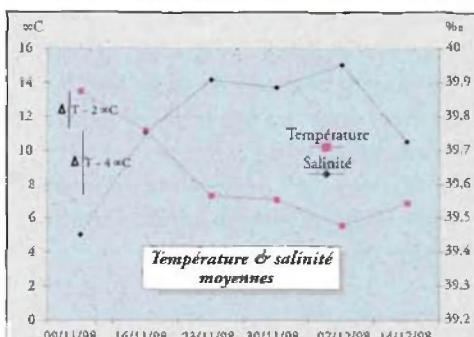
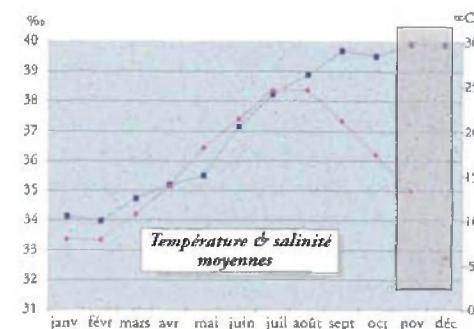
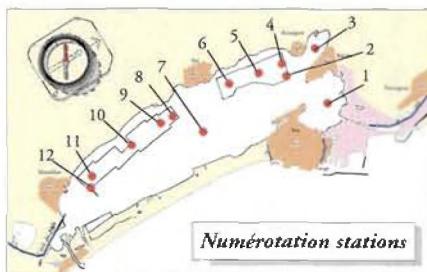


Figure 8
Relations entre le nombre de cellules d'*Alexandrium* par litre d'eau et la concentration PSP ($\mu\text{g éq.STX.100 g}^{-1}$ chair) dans les moules, à Bouzigues et pour l'ensemble de l'étang.

Figure 9
Évolution de la température et de la salinité en 1998 :
 valeurs moyennes au cours de l'année et pendant la période de crise, valeurs enregistrées le 23 novembre 1998 sur chaque station et diagramme T/S correspondant aux données d'octobre et novembre.



À RETENIR

L'épisode d'*Alexandrium tamarense* est apparu fin octobre 1998 dans la partie nord-est de la lagune de Thau. En une semaine, l'ensemble de la lagune était « contaminé ». Cette partie de la lagune est sous influence marine, ce qui peut expliquer les différences hydrologiques observées d'un côté à l'autre de celle-ci, ainsi que la propagation du bloom. Météorologiquement, l'année 1998 se caractérise par un important déficit des précipitations. Les moules ont été fortement contaminées par les toxines PSP, les palourdes à un degré moindre, mais supérieur à la norme internationale. Les huîtres n'ont jamais présenté de valeurs supérieures à 80 µg équivalent STX par 100 g de chair. La décroissance du bloom semble concomitante à la chute de température mesurée lors de la deuxième semaine de novembre. Le 7 décembre, l'absence de cellules est constatée simultanément sur les deux points (Marseillan et Bouzigues) du réseau Réphy.

d'*Alexandrium* dans l'eau semble s'établir sur le point « Bouzigues », il n'en est pas de même lorsque l'ensemble des données disponibles sur la lagune sont prises en considération (fig. 8). Dans le cadre de la procédure d'alerte, la mise en place par le Réphy des tests de toxicité s'est opérée normalement, c'est-à-dire en adaptant le test biologique au type de toxine suspecté, en l'occurrence les PSP habituellement produits par *Alexandrium* sp. C'est donc le test AOAC (voir chapitre II) qui a été pratiqué, avec extraction acide de la chair totale.

Après extraction de la toxine sur des échantillons de moules, les tests biologiques ont confirmé la présence de toxine PSP à un niveau parmi les plus élevés observés en France : 850 µg équivalent STX par 100 g de chair de moule à Bouzigues le 12 novembre (fig. 6). De ce fait, dès le 6 novembre, des échantillons d'eau riches en *Alexandrium* et des échantillons de chair de moules ont été expédiés à l'Ifremer-Nantes pour identification des toxines et établissement du profil toxinique. Cinq toxines différentes, GTX-2, GTX-3, GTX-1, GTX-4 et STX, ont ainsi été identifiées à la fois dans le phytoplancton et dans la chair des coquillages.

Données hydrologiques et météorologiques

Le suivi des paramètres hydrologiques à Thau en 1998 montre une évolution classique des températures avec un maximum atteint en juillet-août et des minima en décembre-janvier. Par contre, pour la salinité qui, généralement, décroît avec les pluies automnales, on constate une augmentation régulière à partir de février (34) jusqu'en novembre-décembre (près de 40). Le suivi spatio-temporel réalisé entre le 9 novembre et le 14 décembre ne révèle toutefois, sur cette période, qu'une faible amplitude des salinités durant le bloom phytoplanctonique (fig. 9).

Par contre, du 9 au 16 novembre, la température moyenne de la lagune va descendre de deux degrés, puis de quatre degrés la semaine suivante. C'est à cette même période que l'on peut constater une décroissance significative du nombre de cellules d'*Alexandrium* sur la crique de l'Angle et à Bouzigues, ainsi qu'une diminution importante des toxines dans les moules. Sur Marseillan, le phénomène semble une fois de plus moins marqué.

L'observation des profils et du diagramme température-salinité durant cette période permet de comprendre le fonctionnement de la lagune. C'est dans la partie est de l'étang que les températures les plus élevées et les salinités les plus basses sont relevées à chaque campagne d'échantillonnage. C'est également de ce côté que les échanges avec la mer (plus chaude et moins salée) sont les plus importants.

Du point de vue météorologique, l'année 1998 sur Sète se traduit par un déficit des précipitations de plus de 300 % par rapport à une moyenne de 35 ans (1961-1995). Cette sécheresse explique donc en partie les salinités élevées durant le bloom phytoplanctonique, anormales à cette époque de l'année (fig. 10). À l'inverse, 1996 présentait un excès de pluie de plus de 300 %.

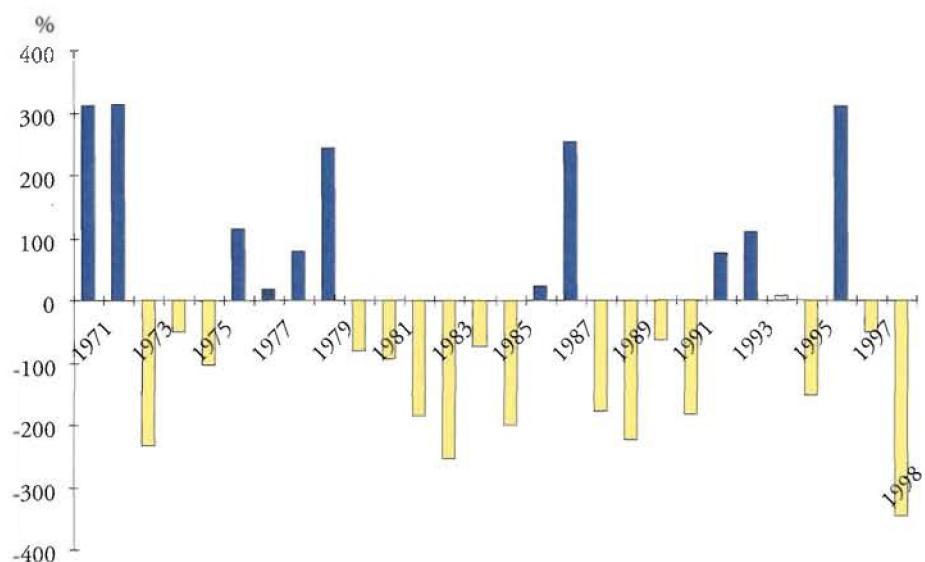


Figure 10
Excès et déficits des précipitations annuelles à Sète par rapport à la moyenne 1961-1995.

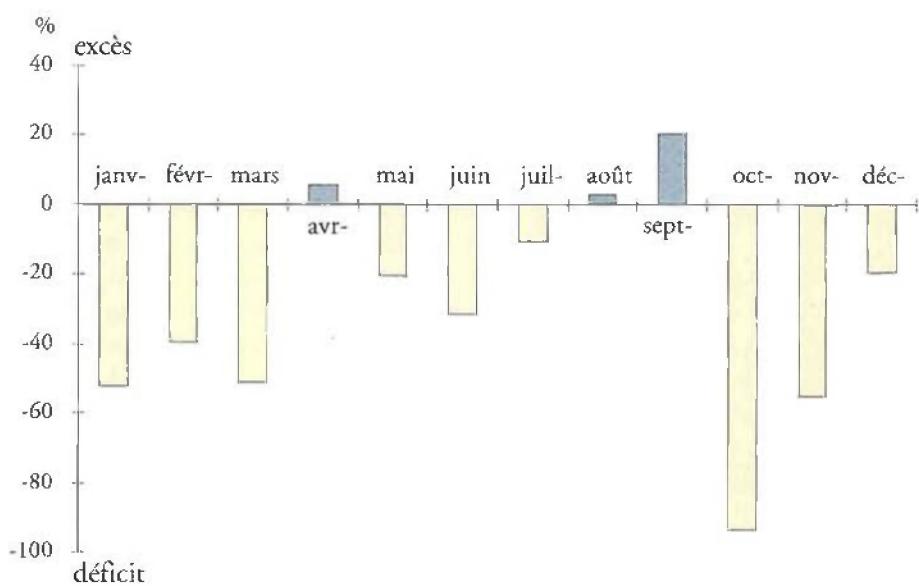


Figure 11
Excès et déficits mensuels des précipitations en 1998 par rapport à la moyenne 1961-1995.

La série des données mensuelles de pluviométrie est également significative des conditions météorologiques à cette époque de l'année, où le seul mois d'octobre présente un déficit en pluie de 95 % (fig. 11).

Chapitre IV

Discussion, perspectives

Discussion, perspectives

Analyse du traitement de la crise

La médiatisation de la contamination PSP des coquillages de l'étang de Thau liée à la prolifération d'*Alexandrium tamarensis* a été très importante et très rapide. Dès le 6 novembre 1998, soit le lendemain de la prise de l'arrêté d'interdiction, la presse (écrite et audiovisuelle) s'est mobilisée. L'approche des fêtes de fin d'année, période de forte consommation d'huîtres, a suscité un intérêt accru des médias sur ce phénomène jamais observé en Méditerranée française.

Conformément à une décision interne (Del/D n° 98-03 et DRV/D n° 98-01 du 1^{er} février 1998), les renseignements communiqués par l'Ifremer à la presse locale et régionale ont été diffusés par le laboratoire côtier de Sète. La presse nationale était informée par le siège de l'Ifremer (direction de la communication) et l'Ifremer-Nantes (direction de l'environnement littoral).

Devant le nombre croissant de questions des professionnels et des journalistes, un bulletin d'information a été édité par le laboratoire côtier de Sète et diffusé à plusieurs centaines d'exemplaires auprès de la profession ; le numéro 1 a été distribué en novembre et le numéro 2 en décembre. Dans le même temps, et avec l'appui technique du responsable réseau de l'Ifremer, un site internet a été mis à la disposition du public. Sur ce site, les informations tirées des bulletins papiers ainsi que les résultats des tests sur souris et des comptages de cellules étaient pratiquement disponibles en temps réel (48 heures de délai environ). Parallèlement, plusieurs réunions d'information pour la profession étaient organisées à Mèze et à Bouzigue (fig. 12).

Tout au long de cette crise, l'ensemble des services de l'État (direction des fraudes, Ddass, DSV et Affaires maritimes) et l'Ifremer n'ont jamais eu de divergence d'appréciation de la situation. Cependant, vers la fin de la crise, au moment de « rouvrir » l'étang pour les huîtres, la Dgal a souhaité que des tests DSP soient réalisés en parallèle entre le Cneva et l'Ifremer.

Propositions

Le développement d'*A. tamarensis* à Thau en novembre-décembre 1998 s'est accompagné d'une apparition de *Dinophysis*, espèce productrice de toxines diarrhéiques (DSP), ce qui a conduit à la réalisation simultanée de deux types de tests de toxicité. Si le test PSP est standardisé, ce n'est pas le cas du test DSP, comme nous l'avons vu précédemment. Les choix méthodologiques différents faits par l'Ifremer (voir plus haut) et par les services vétérinaires ont pu conduire à des difficultés d'interprétation par l'administration en charge des décisions officielles.

Compte tenu des difficultés rencontrées lors de cet épisode, un resserrement du dispositif Réphy a donc été proposé pour l'ensemble des côtes françaises pour l'année 1999. Par ailleurs, afin de trouver une solution satisfaisante au problème du test DSP, un protocole expérimental de comparaison de tests sera appliqué en 1999 sur tous les échantillons analysés à l'Ifremer.

L'intérêt du protocole expérimental mis en place est d'aboutir à une comparaison des résultats obtenus par les deux méthodes : acétone et dichlorométhane. L'analyse des données afférentes à cette étude, qui sera effectuée sur un grand nombre d'échantillons, devrait permettre d'aboutir à une meilleure compréhension de la signification réelle des deux types de tests, l'objectif étant de choisir, en toute connaissance de cause, le test le mieux adapté au problème posé.

Il faut cependant noter qu'une surcharge importante de travail est occasionnée pour les analystes du Réphy par la mise en place de ce protocole expérimental, puisque le nombre de tests sera doublé.

En ce qui concerne les procédures Réphy proprement dites, un seuil national est défini pour chacune des catégories d'espèces toxiques actuellement présentes sur les côtes françaises. La définition de ce seuil relève du principe de précaution qui tient compte de l'analyse des données acquises antérieurement sur l'ensemble du littoral français et, éventuellement, sur les seuils retenus dans d'autres pays européens. Un test de toxicité adapté est mis en œuvre chaque fois que la concentration dans l'eau atteint ou dépasse ce

seuil national. Les règles d'application du seuil sont nuancées par une catégorisation des zones à risque et des périodes de risque sur l'ensemble du littoral.

En fonction des observations réalisées et des premiers résultats obtenus, plusieurs questions émergent. Parmi les plus urgentes à traiter, on peut retenir :

- L'*Alexandrium* de Thau a-t-il été introduit *via* des eaux de ballast ou des transferts de coquillages, ou existait-il depuis longtemps mais à des concentrations trop faibles pour avoir été détecté ?
- Peut-on transférer sans risque des coquillages - même non toxiques - d'une zone où *A. tamarens* prolifère vers une zone saine ? Les rares travaux existant sur ce sujet montrent que des *Alexandrium* toxiques ingérés par les bivalves et rejettés dans les biodépôts sont capables de redonner des formes contaminantes. En dépit d'une absence totale, à l'heure actuelle, de quantification de ce processus, le risque n'est donc pas nul d'une recontamination d'une zone saine, même si les effets n'en sont perçus que plusieurs années plus tard.

• Quel risque y a-t-il d'une autre floraison de cette espèce à Thau ? Tout va dépendre des conditions hydrologiques locales dominantes et des populations phytoplanctoniques et phytobenthiques (kystes) en place à cette période de l'année. Les résultats préliminaires obtenus en 1998 (déficit pluviométrique, salinités élevées) nécessitent, à ce titre, d'être examinés plus en détail.

Il apparaît clairement que le traitement des données disponibles sur l'épisode 1998 devrait permettre de mieux comprendre l'enchaînement des situations qui ont conduit à une dominance d'*A. tamarens* à cette période de l'année, pourtant peu propice aux proliférations phytoplanctoniques. Par ailleurs, dans l'hypothèse où de nouveaux blooms toxiques se reproduiraient, il est primordial que des études sur la ou les souches d'*A. tamarens* présente(s) dans l'étang soient entreprises, afin d'améliorer les connaissances sur cette espèce. Pour cela, il est nécessaire d'obtenir et d'entretenir des cultures de l'espèce dans différents laboratoires spécialisés.

Pour anticiper tout nouvel épisode, un protocole de collecte devra être décrit rapidement, avec une liste de laboratoires susceptibles d'entretenir de telles cultures.

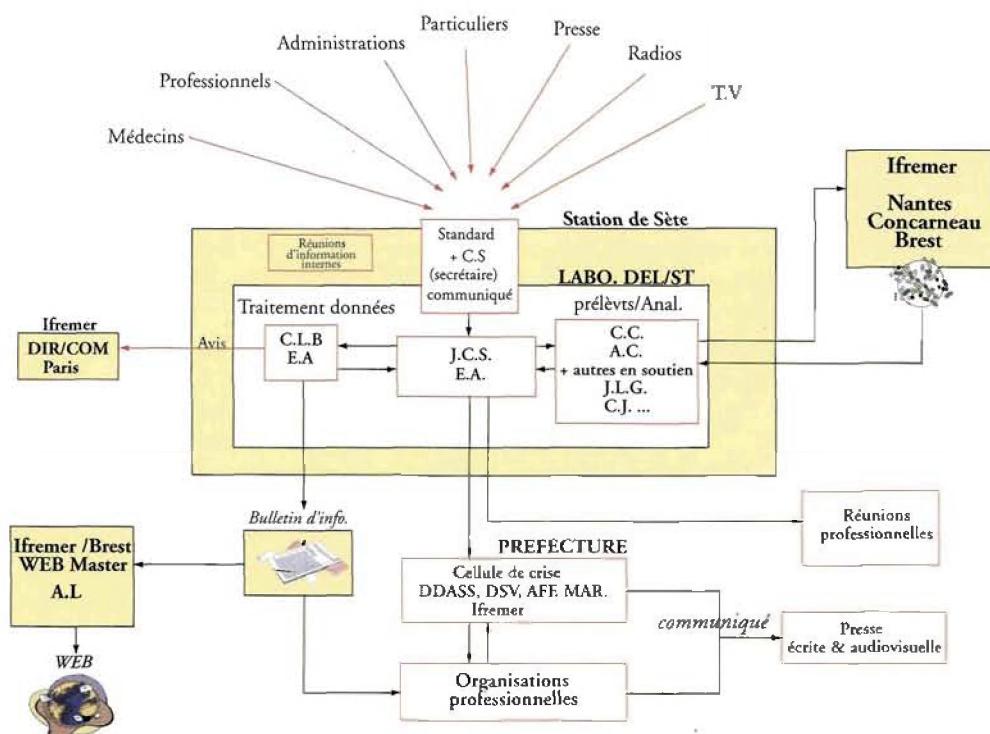


Figure 12
Circulation de l'information
au cours de l'épisode toxique
de l'hiver 1998 à Thau.

Glossaire

Afssas : Agence française de sécurité sanitaire des aliments (créée par la loi du 30 mars 1999).

AO : acide okadaïque.

AOAC : Association of Official Analytical Chemists.

ASP : amnesic shellfish poisons (ou toxines amnésiantes).

BCR : Bureau communautaire de référence.

Bloom : développement exceptionnel d'une espèce phytoplanctonique, encore appelé « efflorescence ». On parle de bloom quand les concentrations sont proches ou supérieures au million de cellules par litre.

CLHP/FL et CLHP/SM : chromatographie liquide haute performance avec détection en fluorescence (FL) et avec couplage à un spectromètre de masse (SM).

Cneva : centre national d'études vétérinaires et alimentaires.

Ddass : direction départementale des affaires sanitaires et sociales.

Dgal : direction générale de l'alimentation.

Ddam : direction départementale des Affaires maritimes.

DPMCM : direction des pêches maritimes et des cultures marines.

DRCCRF : direction régionale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes.

DSP : Diarrheic Shellfish Poisons (ou toxines diarrhéiques).

DSV : direction des services vétérinaires.

DTX : dinophysistoxine.

Elisa : Enzyme linked immunosorbent assay.

GTx : gonyautoxines.

LCHA : laboratoire central d'hygiène alimentaire.

LCR : laboratoire communautaire de référence.

LNR : laboratoire national de référence.

LVD : laboratoire vétérinaire départemental.

PP : protéine-phosphatase.

PSP : Paralytic Shellfish Poisons (ou toxines paralysantes).

PTX : pectenotoxine.

Réphy : réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines. Créé en 1984, il couvre l'ensemble du littoral français.

SMNLR : service maritime de navigation du Languedoc-Roussillon.

STX : saxitoxine.

YTX : yessotoxine.

Références bibliographiques

- Amzil Z., Pouchus Y.-F., Le Botereff J., Roussakis C., Verbiest J.-F., Marcaillou-Le Baut C., Masselin P., 1992. Short-time cytotoxicity of mussel extracts: a new bioassay for okadaic acid detection. *Toxicology*, 30, 1, 1419-1425.
- Amzil Z., 1999. Procédure analytique pour déterminer à la fois la toxicité globale des coquillages sur souris et le type de toxines impliquées. Rapport interne Ifremer, Del/99.04/Nantes, 10 p.
- AOAC [Official Methods of Analysis], 1990. 15th Ed., Arlington, VA, Secs 959.08, 881-882.
- Balech E., 1995. The genus *Alexandrium* *halim* (Dinoflagellata). Co. Cork. Ireland, Sherkin Island Marine Station, Sherkin Island, 151 p.
- Belin C., Marcaillou-Le Baut C., Amzil Z., Ledoux M., 1996. Méthodes de détection des phycotoxines diarrhéiques (DSP) et paralysantes (PSP). Méthodes biologiques sur souris. Rapport Interne Ifremer Del/96.17/Nantes, 28 p.
- Boni L., Pompei M., Reti M., 1986. Maree colorate e fioriture algali lungo la costa dell'Emilia - Romagna dal 1982 al 1985 compaticolare riguardo alla comparsa di *Protogonyaulax tamarensis*. *Nova Thalassia*, 8, 3, 237-245.
- Draisci R., Croci L., Giannetti L., Cozzi L., Lucentini L., De Medici D., Stacchini A., 1994. Comparison of mouse bioassay, HPLC and enzyme immunoassay methods for determining diarrhetic shellfish poisoning toxins in mussels. *Toxicology*, 32, 11, 1379-1384.
- Frémy J.M., Park D.L., Gleizes E., Mohapatra S.K., Goldsmith C.H., Sikorska H.M., 1994. Application of immunochemical methods for the detection of okadaic acid in mussels. *J. Natural Toxins*, 3, 2, 95-105.
- Honkanen R.E., Mowdy D.E., Dickey R.W., 1996. Detection of DSP-toxins, okadaic acid, and dinophysistoxin-1 in shellfish by serine/thereonine protein phosphatase assay. *Journal of AOAC Int.*, 79, 6, 1336-1343.
- Joutei L.T., 1998. *Gymnodinium catenatum* Graham blooms on Moroccan waters. In : Harmful Algae, B. Reguera, J. Blanco, M.L. Fernández, T. Wyatt (editors). Xunta de Galicia and IOC of Unesco Publish, 66-67.
- Kogawa A., Nomura M., Murakami J., Kobayashi E., 1989. The effect of free fatty acids upon the mouse tests of diarrhetic shellfish poisons and the determination of the poison components. *Can. Transl. Fish. Aquat. Sci.*, 5485, 22 p.
- Marcaillou-Le Baut C., Lucas D., Le Déan L., 1985. *Dinophysis acuminata* toxin : status of toxicity bioassays in France. In: Toxic dinoflagellates, D.M. Anderson, A.W. White, D.G. Baden (editors). Elsevier Scientific Publishing, 485-488.
- Marcaillou-Le Baut C., Amzil Z., Vernoux J.-P., Pouchus Y.-F., Bohec M., Simon J.-F., 1994. Studies on the detection of okadaic acid in mussels: preliminary comparison of bioassays. *Natural Toxins*, 2, 312-317.
- Sournia A., Belin C., Berland B., Erard-Le Denn E., Gentien P., Grzebyk D., Marcaillou-Le Baut C., Lassus P., Partensky F., 1991. Le phytoplankton nuisible des côtes de France. De la biologie à la prévention. CNRS-Ifremer (éditeurs) 154 p.
- Takagi T., Hayashi K., Itabashi Y., 1984. Toxic effect of free unsaturated fatty acids in the mouse assay of diarrhetic shellfish toxin by intraperitoneal injection. *Bull. J. Soc. Scient. Fish.*, 50, 8, 1413-1418.
- Utermöhl H., 1958. Zur vervollkommung der quantitativen phytoplankton methodik. *Int. Ver. Theoret. Angew. Limnol.*, 9, 1-38.
- Yasumoto T., Oshima Y., Yamaguchi M., 1978. Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 44, 1249-1255.
- Yasumoto T., Murata M., Oshima Y., Matsumoto G.K., Clardy J., 1984. Diarrhetic Shellfish Poisoning. In: Seafood Toxins, E.P. Ragelis (editor). Am. Chem. Soc., 207-214.

Annexes

Données brutes

Dans l'eau

| Date de prélèvement | Point de prélèvement | Nombre de cellules/litre | Température | Salinité |
|---------------------|----------------------|--------------------------|-------------|----------|
| 26/10/98 | 087001 | 85 000 | | |
| 26/10/98 | 087020 | 0 | | |
| 3/11/98 | 087001 | 90 000 | | |
| 3/11/98 | 087020 | 22 000 | | |
| 6/11/98 | Angle | 270 000 | | |
| 6/11/98 | 087001 | 35 000 | | |
| 9/11/98 | 087001 | 26 200 | 13,2 | 39,3 |
| 9/11/98 | 087020 | 18 000 | 12,7 | 40,2 |
| 9/11/98 | 087016 | 72 500 | 13,5 | 39,7 |
| 9/11/98 | Étang noir | 43 400 | 14 | 39,1 |
| 9/11/98 | 087018 | 6 000 | 13,3 | 40 |
| 9/11/98 | Angle | 350 000 | 12,8 | |
| 9/11/98 | Canaux Sète | 16 200 | 14,4 | 38,4 |
| 12/11/98 | 087015 | 31 200 | | |
| 12/11/98 | 087016 | 53 800 | | |
| 12/11/98 | 087017 | 13 000 | | |
| 12/11/98 | 087018 | 4 400 | | |
| 12/11/98 | 087019 | 5 200 | | |
| 12/11/98 | 087020 | 19 600 | | |
| 12/11/98 | 087001 | 79 000 | | |
| 12/11/98 | 087010 | 54 600 | 11,7 | 40,2 |
| 12/11/98 | 087012 | 15 400 | | |
| 12/11/98 | Angle | 210 000 | 11,6 | 39,6 |
| 12/11/98 | Étang noir | 210 000 | 12,8 | 39,1 |
| 12/11/98 | Milieu étang | 11 400 | | |
| 16/11/98 | 087015 | 5 200 | 11,7 | 39,6 |
| 16/11/98 | 087016 | 15 300 | 11,5 | 39,6 |
| 16/11/98 | 087017 | 20 600 | 11,5 | 39,7 |
| 16/11/98 | 087018 | 9 400 | 11 | 39,8 |
| 16/11/98 | 087019 | 1 000 | 11,1 | 40 |
| 16/11/98 | 087020 | 18 900 | 10,6 | 40,1 |
| 16/11/98 | Angle | 28 200 | 10,6 | 39,6 |
| 16/11/98 | Étang noir | 6 900 | 11,2 | 39,2 |
| 16/11/98 | Milieu étang | 32 300 | 11,2 | 39,9 |
| 16/11/98 | 087001 | 18 600 | 11,5 | 39,6 |
| 16/11/98 | 087010 | 63 600 | 10,5 | 40,2 |
| 16/11/98 | 087012 | 20 200 | 10,9 | 39,7 |
| 18/11/98 | 087001 | 6 500 | | |
| 18/11/98 | 087010 | 7 200 | | |
| 18/11/98 | 087012 | 17 600 | | |
| 18/11/98 | 087015 | 3 700 | | |
| 18/11/98 | 087016 | 10 900 | | |
| 18/11/98 | 087017 | 9 800 | | |
| 18/11/98 | 087018 | 4 800 | | |
| 18/11/98 | 087019 | 6 300 | | |
| 18/11/98 | 087020 | 27 400 | | |
| 18/11/98 | Angle | 5 100 | | |
| 18/11/98 | Étang noir | 2 800 | | |
| 18/11/98 | Milieu étang | 16 400 | | |
| 23/11/98 | 087001 | 400 | 8,2 | 39,8 |
| 23/11/98 | 087010 | 3 400 | 6,7 | 40,2 |
| 23/11/98 | 087012 | 500 | 7,2 | 40,1 |
| 23/11/98 | 087015 | 2 400 | 8,2 | 39,7 |

| Date de prélèvement | Point de prélèvement | Nombre de cellules/litre | Température | Salinité |
|---------------------|----------------------|--------------------------|-------------|----------|
| 23/11/98 | 087016 | 20 400 | 7,9 | 39,9 |
| 23/11/98 | 087017 | 23 300 | 7,8 | 39,9 |
| 23/11/98 | 087018 | 9 000 | 7,1 | 40,1 |
| 23/11/98 | 087019 | 6 700 | 6,3 | 40,2 |
| 23/11/98 | 087020 | 5 900 | 6 | 40,2 |
| 23/11/98 | Angle | 700 | 6,6 | 39,6 |
| 23/11/98 | Étang noir | 200 | 8,1 | 39,2 |
| 23/11/98 | Milieu étang | 900 | 7,6 | 40 |
| 30/11/98 | 087001 | 300 | 7,2 | 39,6 |
| 30/11/98 | 087010 | 800 | 6,4 | 40,2 |
| 30/11/98 | 087012 | 300 | 7,1 | 40 |
| 30/11/98 | 087015 | 200 | 7,2 | 39,7 |
| 30/11/98 | 087016 | 200 | 7,1 | 39,9 |
| 30/11/98 | 087017 | 700 | 7 | 39,9 |
| 30/11/98 | 087018 | 400 | 7,2 | 40 |
| 30/11/98 | 087019 | 200 | 6,9 | 40,1 |
| 30/11/98 | 087020 | 100 | 6,4 | 40,2 |
| 30/11/98 | Angle | 300 | 7,2 | 39,8 |
| 30/11/98 | Étang noir | 0 | 7,9 | 39,2 |
| 30/11/98 | Milieu étang | 1 500 | 6,9 | 40 |
| 7/12/98 | 087001 | 0 | 5,8 | 39,8 |
| 7/12/98 | 087010 | 0 | 5 | 40,2 |
| 7/12/98 | 087012 | 100 | 5,6 | 39,9 |
| 7/12/98 | 087015 | 0 | 5,8 | 39,9 |
| 7/12/98 | 087016 | 0 | 5,8 | 39,9 |
| 7/12/98 | 87017 | 100 | 5,8 | 40 |
| 7/12/98 | 087018 | 0 | 5,4 | 40 |
| 7/12/98 | 087019 | 0 | 5,4 | 40,1 |
| 7/12/98 | 087020 | 0 | 5 | 40,2 |
| 7/12/98 | Angle | 0 | 5,5 | 39,8 |
| 7/12/98 | Étang noir | 0 | 5,7 | 39,6 |
| 7/12/98 | Milieu étang | 300 | 5,6 | 40 |
| 14/12/98 | 087001 | 0 | 7,1 | 39,6 |
| 14/12/98 | 087010 | 0 | 6,6 | 40,1 |
| 14/12/98 | 087012 | 0 | 6,7 | 39,9 |
| 14/12/98 | 087015 | 0 | 6,8 | 39,4 |
| 14/12/98 | 087016 | 0 | 6,5 | 39,8 |
| 14/12/98 | 087017 | 0 | 6,5 | 39,8 |
| 14/12/98 | 087018 | 0 | 6,5 | 40 |
| 14/12/98 | 087019 | 0 | 6,6 | 39,9 |
| 14/12/98 | 087020 | 0 | 6,6 | 39,7 |
| 14/12/98 | Angle | 0 | 6,9 | 39,5 |
| 14/12/98 | Étang noir | 0 | 8,3 | 39,1 |
| 14/12/98 | Milieu étang | 0 | 6,8 | 39,9 |

Dans les coquillages

| N° | Date de prélèvement | Point de prélèvement | Type coquillage | Date d'analyse | Résultat ($\mu\text{g éq. STX par 100 g}$) |
|----|---------------------|----------------------|-----------------|----------------|--|
| 1 | 5/11/98 | 087001 | Moules | 5/11/98 | 852 |
| 2 | 9/11/98 | 087001 | Moules | 10/11/98 | 659 |
| 3 | 9/11/98 | 087010 | Moules | 10/11/98 | 83 |
| 4 | 9/11/98 | 087001 | Huîtres creuses | 10/11/98 | 44 |
| 5 | 9/11/98 | 087020 | Huîtres creuses | 10/11/98 | 1 |
| 6 | 12/11/98 | 087001 | Moules | 13/11/98 | 855 |
| 7 | 12/11/98 | 087010 | Moules | 13/11/98 | 125 |
| 8 | 12/11/98 | 087001 | Huîtres creuses | 13/11/98 | 43 |
| 9 | 12/11/98 | 087020 | Huîtres creuses | 13/11/98 | 1 |
| 10 | 16/11/98 | 087001 | Moules | 17/11/98 | 713 |
| 11 | 16/11/98 | 087010 | Moules | 17/11/98 | 139 |
| 12 | 16/11/98 | 087012 | Moules | 17/11/98 | 159 |
| 13 | 16/11/98 | 087001 | Huîtres creuses | 17/11/98 | 46 |
| 14 | 16/11/98 | 087020 | Huîtres creuses | 17/11/98 | 1 |
| 15 | 16/11/98 | 087017 | Huîtres creuses | 17/11/98 | 1 |
| 16 | 16/11/98 | 087010 | Huîtres creuses | 17/11/98 | 1 |
| 17 | 16/11/98 | 087018 | Huîtres creuses | 17/11/98 | 47 |
| 18 | 16/11/98 | 087019 | Huîtres creuses | 17/11/98 | 1 |
| 19 | 16/11/98 | Roquerols | Palourdes | 17/11/98 | 83 |
| 20 | 18/11/98 | 087001 | Huîtres creuses | 19/11/98 | 47 |
| 21 | 18/11/98 | 087019 | Huîtres creuses | 19/11/98 | 1 |
| 22 | 18/11/98 | 087018 | Huîtres creuses | 19/11/98 | 39 |
| 23 | 18/11/98 | 087020 | Huîtres creuses | 19/11/98 | 1 |
| 24 | 18/11/98 | 087018 | Moules | 19/11/98 | 228 |
| 25 | 18/11/98 | 087010 | Moules | 19/11/98 | 180 |
| 26 | 18/11/98 | 087010 | Huîtres creuses | 19/11/98 | 1 |
| 27 | 18/11/98 | 087017 | Huîtres creuses | 19/11/98 | 1 |
| 28 | 18/11/98 | 087001 | Moules | 19/11/98 | 345 |
| 29 | 19/11/98 | Roquerols | Palourdes | 20/11/98 | 105 |
| 30 | 23/11/98 | Roquerols | Palourdes | 25/11/98 | 101 |
| 31 | 23/11/98 | 087018 | Moules | 24/11/98 | 82 |
| 32 | 23/11/98 | 087001 | Huîtres creuses | 24/11/98 | 46 |
| 33 | 23/11/98 | 087010 | Moules | 24/11/98 | 317 |
| 34 | 23/11/98 | 087020 | Huîtres creuses | 24/11/98 | 1 |
| 35 | 23/11/98 | 087001 | Moules | 24/11/98 | 218 |
| 36 | 30/11/98 | 087001 | Moules | 1/12/98 | 96 |
| 37 | 30/11/98 | 087020 | Huîtres creuses | 1/12/98 | 1 |
| 38 | 30/11/98 | 087010 | Moules | 1/12/98 | 102 |
| 39 | 30/11/98 | 087001 | Huîtres creuses | 1/12/98 | 1 |
| 40 | 1/12/98 | Roquerols | Palourdes | 2/12/98 | 90 |
| 41 | 7/12/98 | 087001 | Huîtres creuses | 8/12/98 | 42 |
| 42 | 7/12/98 | 087020 | Huîtres creuses | 8/12/98 | 1 |
| 43 | 7/12/98 | 087010 | Moules | 8/12/98 | 115 |
| 44 | 7/12/98 | 087001 | Moules | 8/12/98 | 77 |
| 45 | 8/12/98 | Roquerols | Palourdes | 9/12/98 | 83 |
| 46 | 14/12/98 | Roquerols | Palourdes | 15/12/98 | 98 |
| 47 | 14/12/98 | 087001 | Moules | 15/12/98 | - 100 |
| 48 | 14/12/98 | 087010 | Moules | 15/12/98 | 65 |
| 49 | 22/12/98 | 087001 | Moules | 23/12/98 | 60 |
| 50 | 22/12/98 | 087010 | Moules | 23/12/98 | 61 |
| 51 | 22/12/98 | Roquerols | Palourdes | 23/12/98 | 73 |
| 52 | 28/12/98 | 087001 | Moules | 28/12/98 | 60 |
| 53 | 28/12/98 | 087010 | Moules | 28/12/98 | 53 |
| 54 | 28/12/98 | Roquerols | Palourdes | 29/12/98 | 70 |
| 55 | 4/01/99 | 087001 | Moules | 6/01/99 | 53 |
| 56 | 4/01/99 | 087010 | Moules | 6/01/99 | 44 |
| 57 | 7/01/99 | Roquerols | Palourdes | 8/01/99 | 62 |
| 58 | 11/01/99 | 087001 | Moules | 12/01/99 | 52 |
| 59 | 11/01/99 | 087010 | Moules | 12/01/99 | 1 |
| 60 | 13/01/99 | Roquerols | Palourdes | 13/01/99 | 55 |

Sommaire du plan qualité Réphy

- | | |
|---|--|
| 1. Objet | <i>Annexe 1 : Point de prélèvement</i> |
| 2. Responsabilités | <i>Annexe 2 : Quadrigé : création d'un point de prélèvement</i> |
| 3. Points de prélèvement | <i>Annexe 3 : Quadrigé : rattachement d'un point au programme Réphy</i> |
| 3.1. Définitions et caractéristiques | <i>Annexe 4 : Quadrigé : modification intervenant préleur</i> |
| 3.2. Gestion des points de prélèvement | <i>Annexe 5 : Quadrigé : modification taxons présents et à prélever</i> |
| 3.3. Gestion des points/programmes/stratégies dans Quadrigé | <i>Annexe 6 : Quadrigé : modification dans l'application d'une stratégie</i> |
| 4. Demandes d'analyses | <i>Annexe 7 : Planning mensuel des prélèvements</i> |
| 5. Prise en compte des échantillons | <i>Annexe 8 : Fiche matériel de prélèvement</i> |
| 5.1. Prélèvements | <i>Annexe 9 : Tournée de prélèvement</i> |
| 5.1.1. Planification | <i>Annexe 10 : Étiquette de prélèvement eau</i> |
| 5.1.2. Organisation | <i>Annexe 11 : Étiquette de prélèvement matière vivante</i> |
| 5.1.3. Réalisation | <i>Annexe 12 : Registre des échantillons d'eau</i> |
| 5.2. Réception et enregistrement | <i>Annexe 13 : Registre des échantillons de matière vivante</i> |
| 5.3. Mise en attente des échantillons | <i>Annexe 14 : Enregistrement et suivi des souris</i> |
| 5.4. Cas particuliers de la sous-traitance | <i>Annexe 15 : Résultats échantillons d'eau</i> |
| 6. Exécution des analyses | <i>Annexe 16 : Résultats tests DSP</i> |
| 6.1. Méthodes d'analyses | <i>Annexe 17 : Résultats tests PSP</i> |
| 6.2. Conditions de travail | <i>Annexe 18 : Événement</i> |
| 6.2.1. Matériel | <i>Annexe 19 : Fiche événement pour partenaires extérieurs</i> |
| 6.2.2. Observations phytoplanctoniques | <i>Annexe 20 : Diffusion résultats Réphy</i> |
| 6.2.3. Tests de toxicité | |
| 7. Stockage des échantillons | |
| 8. Gestion des résultats | |
| 8.1. Établissement du rapport d'analyses | |
| 8.2. Validation et diffusion des résultats | |
| 8.2.1. Validation | |
| 8.2.2. Diffusion | |
| 8.3. Classement et archivage des documents | |

Réalisation, mise en page : Brigitte Jelidi

Imprimé par COPY News ®

ISSN 1279-8339 - ISBN 2-84433-033-9
Dépôt légal 4^{ème} trimestre 1999

© 1999, Ifremer. Tous droits de reproduction, même partielle,
par quelque procédé que ce soit, sont réservés pour tous pays.

Crédits photos :
couverture, Ifremer/O. Barbaroux et Ifremer/E. Nezan ; p. 10, Ifremer/E. Nezan