

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر و تهيئة الساحل
Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du
Littoral



MEMOIRE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER EN SCIENCES
DE LA MER
Option : AQUACULTURE

Sujet :

Synthèse bibliographique sur les phycotoxines.

Présenté par :

BOUALILI Djouher

BOUKHLEF Hanane

Soutenu le 24 /10 /2013 devant le jury suivant :

M^{me} DJEGHRI HOCINE B.	Professeur	ENSSMAL	Présidente
M^{me} CHAOU N.	Maître assistante (A)	ENSSMAL	Promotrice
M^{me} ALOUACHE S.	Maître de conférences (B)	ENSSMAL	Examinatrice
M^{me} AMAR I.	Maître assistante (A)	ENSSMAL	Examinatrice

Promotion : 2012-2013

REMERCIEMENTS

Nos remerciements s'adressent aux personnes suivantes :

- ② Madame CHAOU N. qui a encadré ce travail, pour sa disponibilité et son aide.

- ② Madame DJEGHRI B. *qui a bien voulu présider ce jury. On tient à lui exprimer notre haute considération et sincères remerciements.*

- ② Madame AMAR I. et Madame ALOUACHE S. *qui ont bien voulu examiner ce travail, qu'elles trouvent ici l'expression de nos remerciements les plus sincères.*

LISTE DES FIGURES

Figure 01 : L'algue <i>Dinophysis</i>	06
Figure 02 : Structure de l'acide okadaïque	07
Figure 03 : mode d'action de l'acide okadaïque (AO) sur les protéines phosphatases.	08
Figure 04 : L'algue <i>Alexandrium tamarense</i>	09
Figure 05 : Principaux sites impliqués dans la formation du complexe toxine / récepteur	10
Figure 06 : L'algue <i>Pseudo-nitzschia</i>	12
Figure 07 : Structure chimique de l'acide domoïque	13
Figure 08 : Mécanisme par lequel l'acide domoïque induit une neurotoxicité sur des cellules nerveuses.	14
Figure 09 : l'algue <i>Gymnodinium breve</i>	15
Figure 10 : structure des brevétoxines	16
Figure 11 : structure des ciguatoxines	18
Figure 12 : L'algue <i>Ostreopsis ovata</i>	19
Figure 13 : structure des azaspiracides	21
Figure 14 : structure chimique des pecténotoxines	22
Figure 15 : Structure chimique des yessotoxines	23
Figure 16 : protocole d'analyse des ciguatoxines par la méthode de bioessai sur souris (Frémy <i>et</i> Lassus, 2001).	30
Figure 17 : schéma d'une électrophorèse capillaire	33
Figure 18 : Plaque de microtitration	34
Figure 19 : ELISA direct.	35
Figure 20 : Zones et coquillages contaminés en 2010 par des toxines lipophiles appartenant au groupe AO+DTXs+PTXs (acide okadaïque + dinophysistoxines + pecténotoxines). Résultats des analyses chimiques par CL-SM/SM (en µg d'équ. AO+PTX2/kg) (REPHY, 2010)	37
Figure 21 : Zones et coquillages contaminés en 2010 par des toxines de la famille de la saxitoxine (PSP). Résultats des bioessais sur souris (en µg d'équ. STX/kg)	38
Figure 2 : Zones et coquillages contaminés en 2010 par des toxines de la famille de l'acide domoïque (ASP). Résultats des analyses chimiques par CL-UV (en mg d'équ. AD/kg)	39
Figure 22 : Toxicité LSTs dans les moules de Dakhla (A), de Laâyoune (B) et d'Agadir (C)	41

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01 : les limites maximales/ kg de chair de mollusque en fonction de groupe de biotoxines.	22
Tableau 02 : avantage et inconvénient des différentes méthodes d'analyse des biotoxines.	33

SOMMAIRE

Introduction	02
Chapitre I : Rappel bibliographique	
I. Les biotoxines	04
II. Les différentes classes de toxines	04
1. Toxines diarrhéiques (DSP : Diarrheic Shellfish Poisoning)	05
1.1. Caractéristiques de l'algue <i>Dinophysis spp</i>	05
a. Les algues concernées	05
b. Répartition géographique de l'algue	06
1.2. Caractéristiques des toxines	06
1.3. Pathogénicité	07
a. Symptômes	07
b. Mode d'action	07
c. Traitement	08
2. Les toxines paralysantes PSP (paralytic shellfish poisoning)	08
2.1. Origine de la toxine	08
2.2. Caractéristiques de l'algue	09
a. Répartition géographique	09
2.3. Caractéristiques des toxines	10
2.4. Pathogénicité	10
a. Symptômes	10
b. Mode d'action	11
c. Traitement	11
3. Les toxines amnésiantes ASP (Amnesic Shellfish Poisoning):	11
3.1. Origine de la toxine	12
3.2. Caractéristiques des Diatomées pennées	12
3.3. Répartition géographique	12
3.4. Caractéristiques de l'acide domoïque	13
3.5. Pathogénicité	13
a. Symptômes	13
b. Mode d'action	14
c. Traitement	15
4. Les toxines neurologiques NSP (Neurotoxic shellfish poisoning)	15
4.1. Caractéristiques de l'algue	16
4.2. Caractéristiques de la toxine	16
4.3. Pathogénicité	16
a. Symptômes	16
b. Mode d'action	17
5. Les toxines de ciguatera	17
5.1. Ciguatoxines	17
5.2. Caractéristiques de la toxine	17
5.3. Mode d'action des ciguatoxines	18
5.4. Effets toxiques chez l'homme	18
5.5. Exemple d'espèces participant au syndrome ciguatérique : L'Ostréotoxine ou palytoxine	19
a. Origine de la toxine	19
5.6. Caractéristique de l'algue <i>Ostreopsis ovata</i>	19
5.7. Caractéristiques de la toxine	20
5.8. Pathogénicité	20

SOMMAIRE

6.	Toxines dont la cible moléculaire n'est pas connue	20
6.1.	Les azaspiracides	20
a.	Effets toxiques chez l'homme	21
6.2.	Les pecténotoxines	21
a.	Effets toxiques chez l'homme	22
6.3.	Les yessotoxines	22
a.	Effets toxiques chez l'homme	23
III.	Les Voies d'exposition aux biotoxines	24
III.1.	l'ingestion	24
III.2.	l'inhalation	24
III.3.	Le contacte cutané	24
IV.	normes limites des biotoxines	
Chapitre II : Techniques d'analyse		
II.	Méthodes d'analyses	26
II.1.	Le bioessai sur souris	26
II.1.1.	L'extraction des toxines	26
a.	Méthode d'analyse des toxines diarrhéiques DSP	26
b.	Méthode d'analyse des toxines paralysantes PSP	27
c.	Méthode d'analyse des toxines amnésiantes	28
d.	Méthode d'analyse des toxines neurologique	29
e.	Méthode d'analyse des ciguatoxines	29
II.2.	Techniques d'analyses basées sur la structure moléculaire	31
II.2.1.	Techniques physicochimiques	31
II.2.1.1.	Méthodes chimique d'analyse par CLHP (Chromatographie liquide à haute performance)	31
II.2.1.2.	Analyses chimiques par la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (CL-SM/SM)	32
II.2.1.3.	Electrophorèse capillaire	32
II.2.2.	Techniques immunologiques	33
II.2.2.1.	La méthode d'ELISA	34
	Le principe de l'ILISA	34
Chapitre III : Résultats		
III.1.	Résultats de réseau des phytoplanctons et phycotoxines (REPHY) :	36
III.1.1	Réseau REPHY	36
III.2.	Résultats obtenus par le Laboratoire Environnement Ressources du Languedoc Roussillon en 2011	40
III.3.	Résultats de la faculté des sciences d'Agadir	40
III.4.	les résultats obtenus au niveau de l'ENSSMAL en 2012	42
	Conclusion	44
	Bibliographie	45

LISTE DES ABRÉVIATIONS

µg : microgramme.

AD: acide domoïque.

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments.

ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire : aliment, environnement, travail.

AO: acide okadaïque.

AOAC: Association of Official Analytical Chemists.

ASP: Amnesic Selfish Poisoning.

AZA: azaspiracide.

AZP: azaspiracid Poisoning.

BVX: brevétoxine.

CTX : ciguatoxine.

DL₅₀ : Dose létale provoquant 50 % de mortalité.

DSP : Diarrheic Shellfish Poisoning.

EC : électrophorèse capillaire

IAFM : intoxication amnésiante par les fruits de mer.

ICP : intoxication ciguatérique par les poissons.

IDFM : intoxication diarrhéique par les fruits de mer.

IFREMER: Institut Français De Recherche Pour l'Exploitation De La Mer.

INFM : intoxication neurologique par les fruits de mer.

kg: kilogramme.

LC: liquid chromatography.

MS: mass spectrometry.

mg: milligramme.

Pdt: pendant.

PSP: paralytic shellfish poisoning.

PTX: pecténotoxine.

STX: saxitoxine.

YTX: yessotoxine.

Introduction :

Depuis les années soixante-dix, on observe une augmentation globale du nombre d'épisodes toxiques liés aux phycotoxines (Hallegraeff, 1995, Bricelj & Shumway, 1998). Ce phénomène peut être la résultante de l'eutrophisation des eaux côtières, provenant des déchets domestiques, industriels ou agricoles et par conséquent augmenter la production primaire et la prolifération de microalgues toxiques.

Les microalgues sont préférentiellement consommées par des organismes filtreurs et notamment des mollusques bivalves. Certaines d'entre elles sont capables de synthétiser des métabolites secondaires toxiques qui sont alors libérés et accumulés chez le consommateur primaire. Ce consommateur primaire va lui-même servir de proie à un consommateur secondaire et ainsi de suite, permettant aux métabolites de s'accumuler dans les différents maillons de la chaîne alimentaire (Jiang *et al*, 2006, 2007).

Ainsi, des mollusques bivalves ou des poissons phytophages peuvent se révéler toxiques en cas de consommation par l'homme et représenter un problème de santé publique et de sécurité alimentaire.

Ces toxines ont plusieurs points communs :

- ✓ elles présentent une grande diversité du point de vue de leur structure chimique et de leurs effets ;
- ✓ elles ont une incidence économique importante du fait du caractère non prédictible de leur présence ;
- ✓ elles doivent faire l'objet d'une surveillance systématique dans les aliments concernés.

Une étude publiée en 2000 estime qu'au niveau mondial, les toxines d'algues sont responsables de 60 000 intoxications humaines par ans avec un taux de mortalité de 1,5 % (IFREMER, 2006).

L'Algérie est parmi les pays touché par ces épisodes toxiques, mais malheureusement ce sérieux problème est toujours négligé par les autorités concernées vue l'absence d'un réseau de surveillance et que la marchandise échappe à tout contrôle sanitaire.

Dans le but de sensibiliser et d'attirer l'attention des scientifiques, des étudiants et de la population, notre mémoire a fait l'objet d'une étude générale concernant :

- les toxines impliquées dans les intoxications causées par les fruits de mer ainsi que leur mécanisme ;
- quelques méthodes utilisées pour la recherche de ces toxines ;
- et certains résultats des épisodes toxiques.

I. Les biotoxines :

Les phycotoxines sont des métabolites secondaires synthétisés par quelques espèces appartenant à deux classes de phytoplancton toxigènes : les dinoflagellés et les diatomées. Leurs efflorescences peuvent alors être directement toxiques pour la faune marine. La transmission de ces molécules toxiques du phytoplancton à l'homme s'effectue toujours à l'aide d'un vecteur –mollusques bivalves, crustacés ou poissons phytophages et carnivores (Amzil *et al*, 2001).

Les algues microscopiques planctoniques constituent la nourriture de base pour un bon nombre d'organismes vivants des océans, notamment pour les bivalves filtreurs commercialisés (moules, huitre, coquilles Saint-Jacques et palourdes) ainsi que pour les larves de crustacés et de poissons. Dans la plupart des cas, les proliférations ou les efflorescences algales sont bénéfiques pour la faune et l'aquaculture. Toutefois sous certaines conditions hydrologiques et climatologiques, des espèces peuvent se développer si intensément qu'elles en arrivent à modifier la couleur apparente de la surface des mers et à conduire à des épisodes d'eaux colorées (Reizopoulou *et al*, 2008).

L'origine algale de certaines intoxications faisant suite à la consommation de produits de la mer n'a été découverte qu'en 1937 par Sommer et Meyer pour les toxines paralysante PSP et en 1979 pour la ciguatera (Yasumoto *et al.*, 1979). Depuis les années soixante-dix, on observe une augmentation globale du nombre d'épisodes toxiques liés aux phycotoxines (Hallegraeff, 1995 ; Bricelj et Shumway, 1998).

Les empoisonnements les plus communs sont liés à l'ingestion de la toxine PSP qui dans des cas extrêmes peut entraîner la mort par paralysie respiratoire. La toxine DSP qui cause des troubles gastro-intestinaux sévère et la toxine ASP qui peut conduire à des dommages cérébraux permanents avec des pertes de mémoire (Quilliam *et al*, 1995).

II. Les différentes classes de toxines :

Jusqu'à 2006, les scientifiques ont identifié six syndromes alimentaires dus à des phycotoxines : cinq pour lesquels les vecteurs sont les coquillages et un lié à la consommation de poissons tropicaux. Il est d'usage de dénommer les familles de toxines en fonction des syndromes qu'elles induisent chez l'homme. Ainsi, cinq familles contaminent les coquillages :

- Les phycotoxines diarrhéiques et associées, provoquant l'intoxication diarrhéique par les fruits de mer (IDFM) (ou DSP) ;
- Les phycotoxines paralysantes, provoquant l'intoxication paralysante par les fruits de mer (IPFM) (ou PSP) ;
- Les phycotoxines amnésiantes, provoquant l'intoxication amnésiante par les fruits de mer (IAFM) (ou ASP) ;
- Les phycotoxines neurologiques, provoquant l'intoxication neurologique par les fruits de mer (INFM) (ou NSP) ;
- Les toxines dont la cible moléculaire n'est pas connue (les azaspiracides, pecténotoxines et yessotoxines). Ces molécules sont également responsables d'un syndrome de nature diarrhéique, mais elles ont été volontairement singularisées car leur mode d'action est différent de celui des autres toxines diarrhéiques.

On compte également une famille contaminant les poissons tropicaux : les phycotoxines ciguatériques, provoquant l'intoxication ciguatérique par les poissons (ICP), de nature gastro-intestinale et neurologique (krys *et al*, 2002).

1. Toxines diarrhéiques (DSP : Diarrheic Shellfish Poisoning) :

Les toxines DSP regroupent l'ensemble des toxines ayant un effet diarrhéique. Elles sont présentes dans les dinoflagellés marins : *Dinophysis spp.*

On distingue plusieurs toxines parmi cette famille, dont La principale toxine étant l'**acide okadaïque** (Baylet *et al*, 2004 et Frémy, 2001).

1.1. Caractéristiques de l'algue *Dinophysis spp* :

a. Les algues concernées :

les toxines DSP sont produites par le genre *Dinophysis* qui appartient à la classe des dinophycées, et regroupe plusieurs espèces qui produisent pour la majorité d'entre elles des toxines. Sur la centaine de dinoflagellés répertoriés dans le monde, six seraient présents sur les cotes françaises : *Dinophysis sacculus*, *Dinophysis acuminata*, *Dinophysis acuta*, *Dinophysis rotundata*, *Dinophysis caudata* et *Dinophysis fortii* ; ce sont toutes des espèces pélagiques. Les Dinoflagellés de l'ordre des Prorocentrales comprennent les genres *Mesoporos* et *Prorocentrum*. Le genre *Prorocentrum* comprend à la fois des espèces pélagiques et bentiques , et ce sont ces dernières (*P. lima*, *P. maculosum*, *P. reticulatum* et *P.concavum*) qui produisent des toxines diarrhéiques (Frémy *et al*, 2001).

CHAPITRE I : RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

Ce genre à un faible taux de développement, les concentrations maximales sont généralement comprises entre 1000 et 10000 cellules par litre (Baylet *et al*, 2004).

Le cycle biologique de *Dinophysis* est mal connu mais il a été montré que la toxicité maximale est atteinte en fin de phase de croissance ou en début de phase stationnaire au cours du cycle biologique de l'algue. Frémy *et al*, (2001) ont remarqué que les toxines polyéther comme l'acide okadaïque étaient le produit de la photosynthèse des Dinoflagellés. Elles seraient conservées dans des compartiments cellulaires distincts de l'organisme.

Egalement, la stratification des masses d'eau en couches de température et de salinité différentes semble favoriser la prolifération de cette algue.

Par contre, selon le rapport de la journée scientifique de l'AFSSA du 6 mars 2003, des doutes apparaissent quant à la production de la toxine. Il se pourrait en effet que cette toxine soit produite par un autre organisme, prédateur des dinoflagellés comme les *Prorocentrum* benthiques.

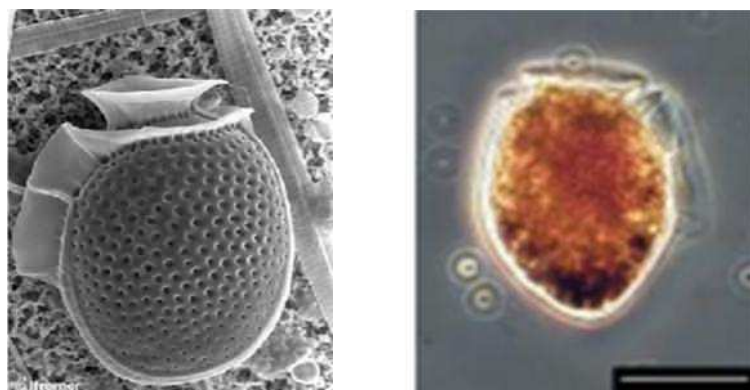


Figure 01 : L'algue *Dinophysis* (Ifremer, 2006).

b. Répartition géographique de l'algue :

Selon l'étude de René Baylet *et al* (2004), cette algue apparaît en toute saison sur les côtes françaises (Atlantique et Méditerranée). Toutefois, selon l'enquête de Leroux (2006), la toxine est repérée sur une période plus tardive en Normandie, et sur une période plus étalée en Bretagne, et Méditerranée où elle peut survenir toute l'année.

1.2. Caractéristiques des toxines :

Ces toxines sont solubles dans l'acétone, le dichlorométhane, le chloroforme et le méthanol. Etant stables à la chaleur, il est inutile de cuire les coquillages pour les éliminer. L'acide okadaïque et ses dérivés lipophiles sont la base des toxines diarrhéiques. La structure chimique de base est la suivante :

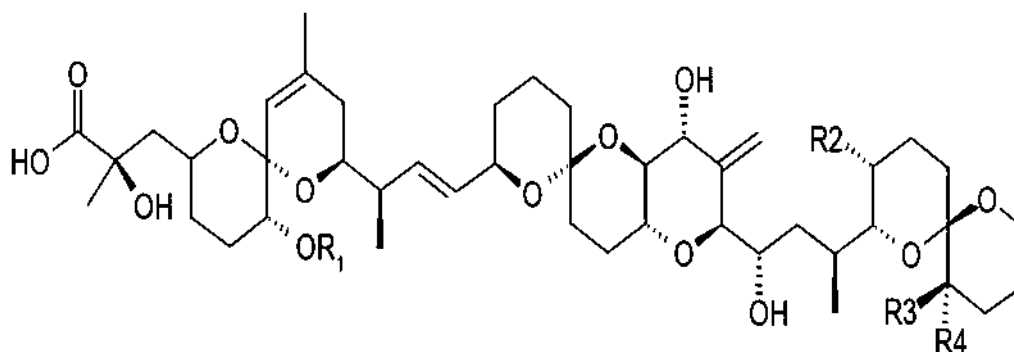


Figure 02 : Structure de l'acide okadaïque (DAO, 2006)

1.3. Pathogénicité :

a. Symptômes :

La plupart des toxines DSP ont une action diarrhéique due à leurs fonctions inhibitrices des protéines phosphatases, elles provoquent chez le consommateur une intoxication dont les effets apparaissent dans un délai de 2 à 12h après l'ingestion des coquillages contaminés. Les principaux symptômes sont des diarrhées, des douleurs abdominales et des nausées voire des vomissements. La vitesse d'incubation permet de différencier une intoxication alimentaire d'un autre type de diarrhée aiguë (Frémy, 2001). La mortalité de l'acide okadaïque est de 0% (Château-Degat, 2004).

Une étude de Yasumoto (1978) observait les premiers signes cliniques dès 48 µg d'équivalent en AO.

L'acide okadaïque et son dérivé, la dinophysistoxine I (DTXI), seraient de puissants promoteurs dans le processus de la cancérogenèse selon Fujiki *et al*, 1986.

b. Mode d'action :

Les DTX et AO sont des inhibiteurs des protéines phosphatases à sérine et thréonine (Puisseux-Dao *et al*. 2001). Elles permettent la déphosphorylation des résidus de serine et thréonine (Fig. 3).

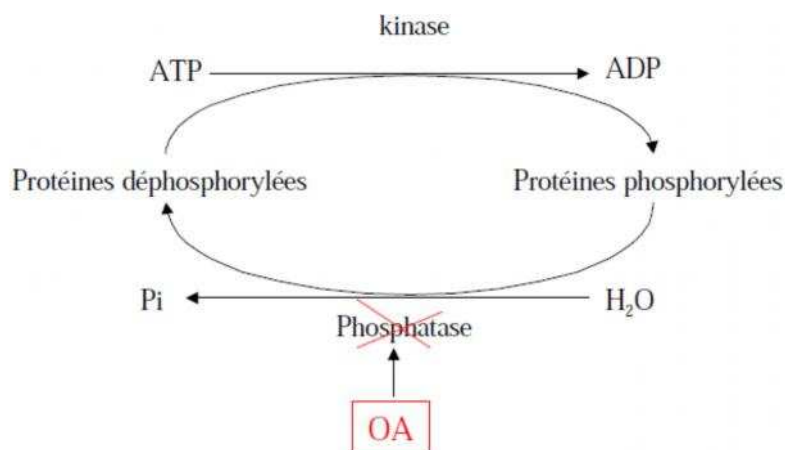


Figure 03 : mode d'action de l'acide okadaïque (AO) sur les protéines phosphatases.

(Puisseux-Dao *et al.*, 2001)

c. Traitement :

Selon l'étude de Scheiner (2002), une guérison complète et sans séquelle est possible en trois jours après un traitement symptomatique et d'appoint. Le faible délai d'incubation ainsi qu'une analyse des selles permettent d'exclure toute autre cause d'intoxication diarrhéique.

2. Les toxines paralysantes PSP (paralytic shellfish poisoning) :

Le premier rapport faisant état de la toxicité de coquillages date de 1798 à la suite de l'intoxication d'une partie d'un équipage lors d'une expédition à Vancouver (Canada) en 1793 (Ifremer, 2001). Un test sur les souris a été mis en place pour éviter toute intoxication due à la consommation de mollusques bivalves.

2.1. Origine de la toxine :

Les saxitoxines sont produites par des microalgues marines mais également par des cyanobactéries d'eau douce. Les microalgues marines productrices de toxines paralysantes appartiennent toutes à la classe des dinoflagellés. Les dinoflagellés peuplent toutes les eaux, marines ou douces, mais seuls les dinoflagellés marins peuvent synthétiser des toxines. En 2008, environ 20 espèces de dinoflagellés capables de produire des toxines paralysantes ont été répertoriées (Estrada *et al*, 2007 ; Vale, 2008).

Les dinoflagellés marins producteurs de toxines appartenant principalement à l'espèce *Gonyaulax* (actuellement *Alexandrium*). Les espèces productrices de saxitoxine les plus étudiées sont *Alexandrium minutum*, *Alexandrium tamarense* et *Alexandrium catenella*.

La saxitoxine est la toxine de base de 18 molécules chimiquement proches : la famille des toxines PSP (Paralytic Shellfish Poisoning). Parmi les dérivés de la STX, il y a les gonyautoxines (GTXs) et la néosaxitoxine (Institut National de Veille Sanitaire, novembre 2001).

Toutes les toxines paralysantes ne sont pas produites par les microalgues, quelques-unes résultent d'une dégradation ou d'une transformation des toxines algales par les coquillages



Figure 04 : L'algue *Alexandrium tamarense* (Photo E. Nizan/Ifremer, 2006)

2.2. Caractéristiques de l'algue :

a. Répartition géographique :

Le genre *Alexandrium* est présent sur tous les continents (eaux froides ou chaudes du globe) avec en particulier le nord-ouest du Pacifique, sur la côte nord-est de l'Amérique du Nord et en Europe du Nord (Hall *et al*, 1990). Les toxines paralysantes ont été détectées la première fois en France en 1988 (Masselin *et al*, 2000, Sechet *et al*, 2003) dans les Abers (Bretagne nord). Ces toxines initialement localisées en Bretagne Nord (Zone des Abers, baie de Morlaix, estuaire de la Rance), se retrouvent dans l'étang de Thau à partir de 1998. La zone de prolifération, bien qu'il ne s'agisse pas des mêmes espèces d'*Alexandrium*, s'étend ensuite à la rade de Toulon en 2000, puis au bassin d'Arcachon (Banc d'Arguin) en 2002.

Des épisodes toxiques liés à la présence de toxines paralysantes ont été mis en évidence en Ecosse (Collins *et al*, 2009), en Espagne (Blanco *et al*, 2006), en France (Lassus *et al*, 2004, 2006), en Grèce (Ignatiades *et al*, 2007), en Irlande (Stobo *et al*, 2008, Touzet *et al*, 2008), en Norvège (Sayfritz *et al*, 2008) et au Portugal (Artigas *et al*, 2007).

2.3. Caractéristiques des toxines :

Ces toxines sont des bases tétrahydropuriques substituées. Elles sont hydrosolubles, thermostables et stables en milieu acide. Par contre, ces toxines sont fragiles en milieu alcalin et sensibles aux oxydants. La majorité des dérivés sont le résultat d'une sulfatation à certains endroits des deux molécules de base : la saxitoxine et la néosaxitoxine (Ifremer, 2006).

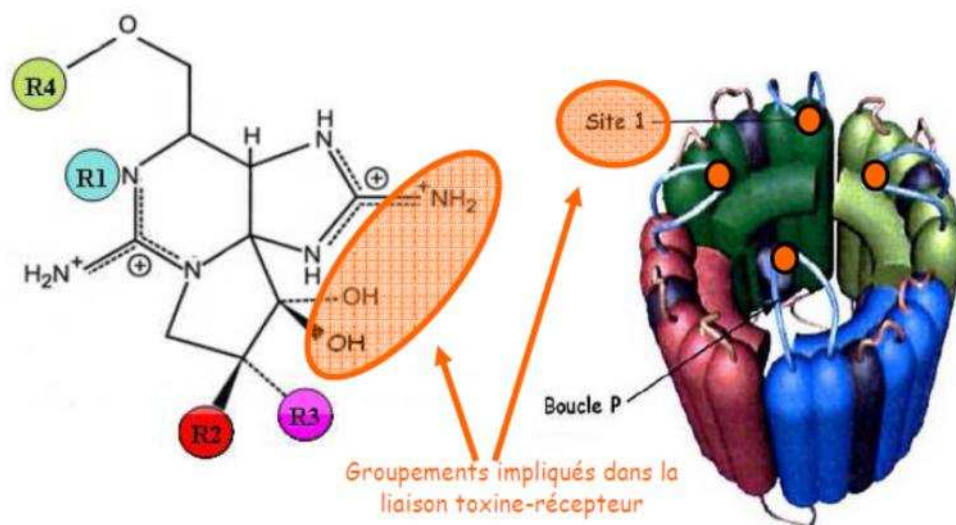


Figure 05 : structure chimique de la saxitoxine et les principaux sites impliqués dans la formation du complexe toxine / récepteur (Ledreux, 2010)

2.4. Pathogénicité :

a. Symptômes :

Les molécules de la famille de la STX ont un fort pouvoir neuromusculaire, si bien qu'en cas d'intoxication extrême, il est possible d'observer des paralysies musculaire et des difficultés respiratoires, pouvant entraîner la mort. Les premiers signes cliniques apparaissent dans les 30 à 60 minutes après ingestion, ils sont d'abord de nature gastro-intestinale, puis d'ordre neurologique. On distingue trois degrés d'intoxication en fonction de la gravité des symptômes observés. Le niveau bénin correspond à une paresthésie buccale, pouvant s'étendre au visage et au cou, puis aux extrémités des doigts et aux orteils ; des nausées et parfois des vomissements sont observés. Les symptômes de niveau sévère recouvrent des paresthésies s'étendant aux bras et aux jambes, une incohérence de la parole, des sensations d'engourdissement et d'ataxie, l'apparition de difficultés respiratoires et des sensations d'étouffement. Le niveau extrême présente des sensations de choc, des paralysies motrices et

en particulier respiratoires pouvant conduire à la mort en l'absence d'assistance respiratoire. La dose létale pour l'homme est comprise, selon la sensibilité de chacun, entre 1 et 4mg équivalent STX.

b. Mode d'action :

Les toxines paralysantes agissent en bloquant l'activité des canaux sodiques membranaires des cellules neurales. Ces canaux interviennent largement dans la communication électrique cellulaire, leurs ouvertures et fermetures étant responsables de l'activation et de l'inactivation du potentiel d'action. Les toxines se fixent sur les canaux sodiques avec une réponse de type tout ou rien (figure 05). Mais il a été montré que les STXs pourraient agir au niveau des canaux calciques et potassiques mais pour des concentrations de l'ordre du micromolaire, soit mille fois plus élevées que pour les canaux sodiques (Wang *et al*, 2003 ; Su *et al*, 2004).

c. Traitement :

Le traitement est seulement symptomatique puisqu'il n'existe pas d'antidote, ni de vaccin. Il peut consister en un lavage gastrique et prise de charbon activé pour adsorber les toxines. Dans les cas graves, la respiration artificielle et l'hémodialyse (les toxines, étant hydrosolubles, sont éliminées par les reins) peuvent s'avérer nécessaires (BELIN *et al*, 1998).

3. Les toxines amnésiantes ASP (Amnesic Shellfish Poisoning):

Les premier cas d'intoxications amnésiantes se sont déclarés fin 1987 à la suite de la consommation de moules récoltées dans l'estuaire de l'île-du-Prince Edouard (Canada). Les symptômes observés étaient des troubles digestifs, neurologiques et surtout une perte de mémoire (Smith, 1993).

Après les recherches intensives, la phycotoxine de ces IAFM a été identifiée comme étant l'acide domoïque (Wright *et al*, 1989) ce composé a été isolé précédemment au Japon à partir de l'algue rouge *Chondria armata domoi* (Takemoto *et* Daigo, 1958).

3.1. Origine de la toxine :

L'acide domoïque est une toxine produite par certaines diatomées (notamment *Pseudo-nitzschia multiseris*, *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima*, *Pseudo-nitzschia pungens* et *Pseudo-nitzschia delicatissima*) (Krys *et al*, 2002).



Figure 06: L'algue *Pseudo-nitzschia* (Ifremer, 2001)

3.2. Caractéristiques des Diatomées pennées :

Les diatomées pennées sont des algues unicellulaires, souvent coloniales et qui ne sont jamais flagellées pendant leur phase végétative. Elles se regroupent pour former macroscopiquement des filaments. Elles sont photo-autotrophes. Les espèces les plus toxiques sont *multiseris*, *pseudodelicatissima* et *australis*.

Les efflorescences à *Pseudo-nitzschia* semblent favorisées par les rapports d'eaux douces riches en silicate et l'augmentation des proliférations est sans doute liée à l'eutrophisation des eaux côtières.

3.3. Répartition géographique :

L'espèce responsable de cette intoxication comme étant la diatomée *Pseudo-nitzschia pungens* a été détectée au Canada, Nouvelle Zélande et côtes californiennes, tandis que d'autres espèces de *Pseudo-nitzschia*, susceptibles d'être toxiques, ont ensuite été décelées dans plusieurs pays d'Europe, en particulier en Ecosse (Ifremer, 2006).

3.4. Caractéristiques de l'acide domoïque :

Il s'agit d'un acide aminé secondaire tricarboxylique de formule $C_{15}H_{21}NO_6$ comprenant 15 atomes de carbone et dont la chaîne latérale possède deux liaisons éthyléniques. L'acide domoïque est thermostable, soluble dans les solvants et instable en milieu acide. A des températures élevées ($> 50^{\circ}C$), il se produit une isomérisation progressive de l'acide domoïque pour donner principalement son épimère, l'acide épidoïme. En plus de ce dernier, seuls les acides isodomoïque D, E et F sont impliqués dans les intoxications amnésiantes. La toxicité de l'acide domoïque varie fortement suivant son degré de protonation et donc suivant le pH. La DL_{50} sur la souris est de $120\mu g/kg$ et chez l'humain de 1 à 5 mg/kg. (Chateau-Degat, 2004).

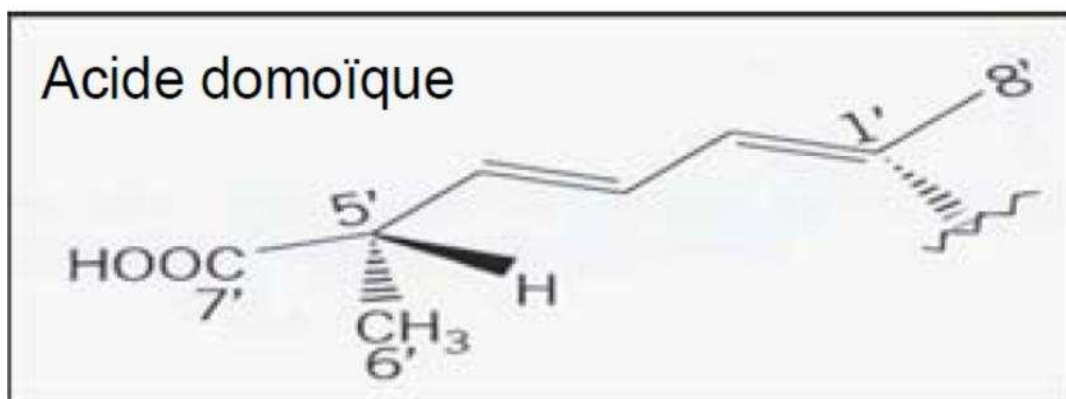


Figure 07 : Structure chimique de l'acide domoïque (Dao, 2006).

3.5. Pathogénicité :

a. Symptômes :

Les premiers symptômes, de type gastro-intestinal (vomissement, diarrhées, nausées...) surviennent dans un délai de 2 à 24 heures après consommation des coquillages. Entre 24 et 48 heures ce sont des symptômes neurologiques qui sont observés (maux de tête persistants, désorientation et une confusion). Dans les cas les plus graves, il apparaît une perte de mémoire, des dommages cérébraux et parfois des convulsions ainsi qu'un coma pouvant conduire à la mort.

Ce type d'intoxication atteint surtout les enfants et les personnes âgées. Il est à noter que la gravité des signes neurologiques est en relation avec l'âge des patients. Plus le sujet est âgé, plus les signes cliniques sont marqués (Ifremer, 2006).

b. mode d'action :

L'AD active des récepteurs glutamatergiques au niveau du système nerveux central. Les différents types de récepteurs ionotropiques activés par le glutamate (GLU) ont été nommés d'après leur agoniste le plus sélectif. Ils comprennent les récepteurs AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozol-4-propionate), kaïnate et NMDA (N-méthyle-D-aspartate). L'AD est un agoniste des récepteurs ionotropiques glutamatergiques. Sur des cellules en culture de la couche granuleuse du cervelet de rat, l'AD tout comme le GLU provoque une cytotoxicité mise en évidence par la libération du lactate déshydrogénase. La cytotoxicité induite par l'AD est réduite d'environ 70% lorsque les cellules sont prétraitées avec des antagonistes compétitifs et non compétitifs des récepteurs NMDA (Larm *et al*, 1997).

La dépolarisation de la cellule présynaptique active la libération de Ca^{2+} endogène, ce qui a pour effet d'entraîner les vésicules contenant le GLU vers la surface de la cellule. Le GLU est

alors libérée dans l'espace synaptique où il peut interagir avec les différents récepteurs. L'AD exogène peut également agir avec les différents récepteurs glutamatergiques.

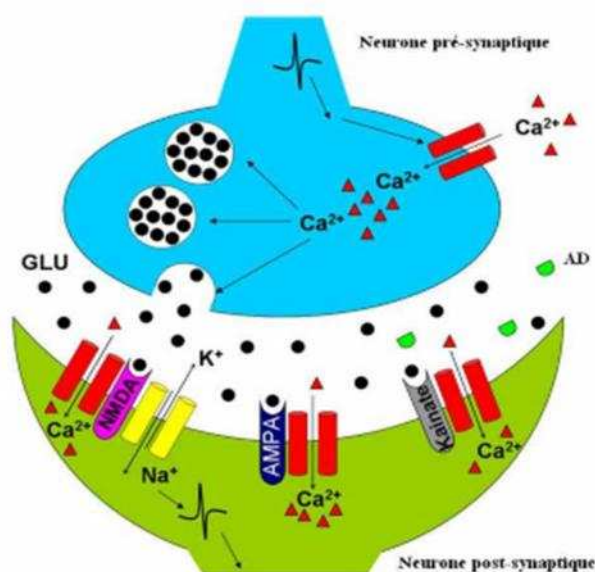


Figure 08 : Mécanisme par lequel l'acide domoïque induit une neurotoxicité sur des cellules nerveuses (Lefebvre et Robertson, 2009).

c. Traitement :

Pour le moment, il n'y a pas d'antidote à cet empoisonnement dont le traitement est symptomatique (Ifremer, 2001).

4. Les toxines neurologiques NSP (Neurotoxic shellfish poisoning):

Les intoxications neurologiques causées par les fruits de mer (INFM) sont assez peu commune, l'alerte étant vite donnée du fait du fort potentiel ichtyotoxique des brévéttoxines qui provoquent des morts massives de poissons, très visibles, et des problèmes respiratoires pour les baigneurs. La Brévéttoxine est produite par un dinoflagellé : *Gymnodinium breve*.

4.1. Caractéristiques de l'algue :

Gymnodinium breve forme des marées rouges très caractéristiques, qui sont devenues l'emblème des algues toxiques nuisibles.

Cette algue est présente dans des eaux chaudes : les côtes du Mexique, de la Floride et de Nouvelle Zélande. Elle a été signalée en France et en Espagne (Méditerranée), sans être associée à des efflorescences toxiques.

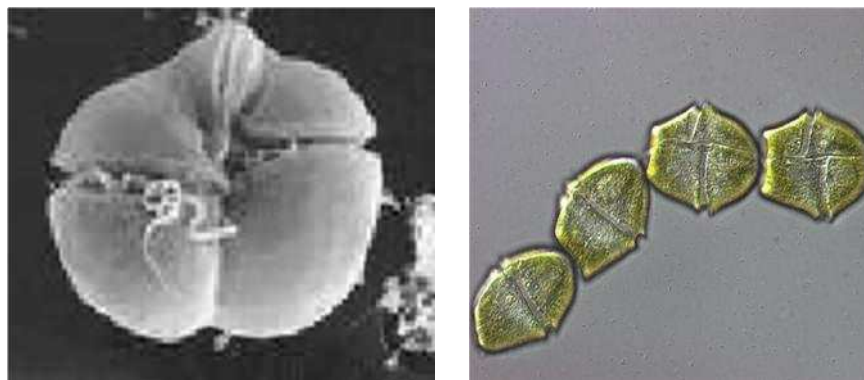
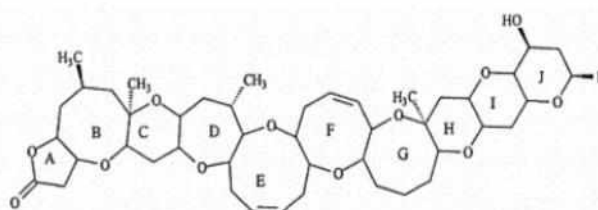


Figure 09: l'algue *Gymnodinium breve* (Photo E. Nizan/Ifremer, 2006)

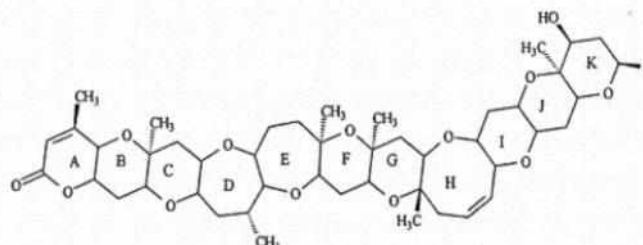
4.2. Caractéristiques de la toxine :

Il s'agit d'un polyéther cyclique avec une structure propre aux dinoflagellés dans le monde des produits naturels. Il existe plusieurs molécules dérivées : BVX1, BVX2,...

Brévétoxines de type 1 (ou A)



Brévétoxines de type 2 (ou B)



Brévétoxine B3

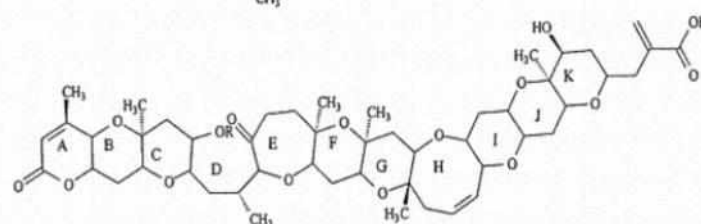


Figure 10: structure des brévétoxines (Baden et Adams,

4.3. Pathogénicité :

Les intoxications liées à la brévétoxine sont peu communes. Deux voies d'exposition ont des effets sur l'homme : l'ingestion de fruits de mer et l'inhalation (forme aéroportée).

a. Symptômes :

Les effets sont peu sévères par ingestion (INFM) : paresthésie, vertiges, ataxie et perturbations gastro-intestinales. Quelques cas d'atteintes cutanées et pulmonaires ont été

recensés chez des promeneurs : irritations et brûlures des voies respiratoires. La mortalité est de 0% (aucun décès n'a jamais été reporté). La DL₅₀ est de 1-4 mg/kg (Château-Degat, 2004).

b. Mode d'action :

Ces toxines agissent sur les cellules du système nerveux central et périphérique par liaison aux canaux sodiques voltages dépendants, ce qui conduit à un état de subconductance.

5. Les toxines de ciguatéra :

La ciguatéra est un phénomène très ancien décrit par les premiers navigateurs dès 1555 dans l'île du caraïbe puis dans l'océan Indien et l'océan Pacifique. Cependant, le terme ciguatéra ne trouve son origine qu'en 1866 à Cuba et il a été forgé à partir du nom cubain d'un coquillage, qui a provoquait à l'époque des intoxications après ingestion. L'usage de ce terme a été ensuite étendu à toute intoxication alimentaire par les produits de la mer donnant lieu à des troubles gastro-intestinaux et neurologiques graves. De ce fait, des intoxications par poisson ayant pour origine l'acide okadaïque produit par *Prorocentrum concavum*, *P. lima* et *P.mexicanum* au niveau tropical ont pu être assimilées à la ciguatéra.

D'autres toxines produites par *Amphidinium spp.et ostreopsis siamensis*, *O.lenticularis* et *O. ovata* ont aussi été impliquées (Frémy et Lassus, 2001)

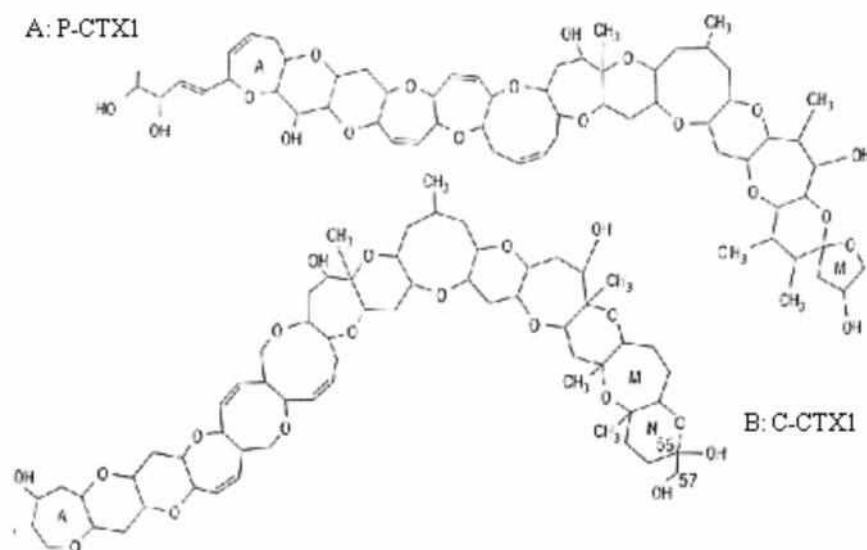
5.1. Ciguatoxines :

Les ciguatoxines (CTXs) sont les principales toxines de la ciguatéra. Au niveau français, cette endémie que l'on appelle ICP (intoxication ciguatérique due aux poissons) ou CEP (ciguatera fish poisoning) est très présente en Polynésie française et dans toutes les Antilles avec une morbidité allant de 0,04 à 1% selon les îles (; Bourdeau, 1986 ; Vernoux, 1988; Bagnis *et al*, 1992 ; Lewis, 1993 et Glaziou *et* Legrand, 1994).

Les ciguatoxines sont produites par le dinoflagellé benthique *Gambierdiscus spp.* et sont bioaccumulées via la chaîne trophique dans des poissons des zones tropicales (Antilles, Océan Indien et Océan Pacifique).

5.2. Caractéristiques de la toxine :

Il a été prouvé que ces toxines, à l'état brut ou semi-purifié, résistaient parfaitement à la chaleur. Egalement il a été observé une sensibilité au pH inversée entre les toxines du Pacifique et des Antilles puisque celles de Tahiti sont stables en milieu basique fort et instable en milieu acide (Frémy *et* Lassus, 2001). Les CTXs sont des polyéthers lipophiles dont la structure de base diffère selon l'origine géographique.



A : isolée de poissons de l'Océan Pacifique,

B : isolée de poissons des Caraïbes

Figure 11: structure des ciguatoxines (Legrand *et al*, 1992).

5.3. Mode d'action des ciguatoxines :

Les ciguatoxines, tout comme les brévétotoxines, agissent au niveau du site 5 de la sous unité α du canal sodium voltage-dépendant (Lombet *et al*, 1987). Un grand nombre d'études a également mis en évidence d'autres effets pharmacologiques des CTXs.

5.4. Effets toxiques chez l'homme :

Les CTXs sont à l'origine de la ciguatera, plus communément appelée « maladie de la gratte ». Entre 20000 et 60000 personnes sont affectées chaque année par cette pathologie spécifique des régions concernées où le poisson est l'un des aliments de base (Lehane *et Lewis*, 2000). La ciguatera est caractérisée par un ensemble de symptômes gastro-intestinaux, neurologiques et cardiologiques (Dickey *et Plakas*, 2009). Selon Kumar-Roine *et al* (2008), le large spectre de symptômes provoqué par l'ingestion de poissons ciguateriques ne peut pas être expliqué uniquement par la liaison des CTXs sur le canal sodium voltage-dépendant. Exemple d'espèces participant au syndrome ciguaterique : L'Ostréotoxine ou palytoxine .

5.5. Origine de la toxine :

L'ostreotoxine est une toxine synthétisée par un dinoflagellé benthique : *Ostreopsis ovata*. Dans les zones tropicales, cette algue fréquente les mêmes biotopes que *Gambierdiscus spp.*, responsable de la ciguatera. L'ostreotoxine pourrait donc participer au

syndrome ciguatérique. Toutefois, il est actuellement possible de la différencier de ciguatéra (symptomatologies différentes) (Frémy *et al*, 2001). C'est une toxine émergente.

5.6. Caractéristique de l'algue *Ostreopsis ovata* :

Il s'agit essentiellement d'une algue tropicale que l'on retrouve sur les côtes de Nouvelle Calédonie, de Polynésie Française, de la Mayotte et de la Réunion ; mais aussi et depuis peu, en Méditerranée. Cette algue est difficilement repérable de par sa nature benthique : elle vit au fond de la mer. Toutefois, elle a été retrouvée entre 1994 et 1997 en Camargue, dans le golfe de Fos et la rade de Toulon.

Elle s'accroche sur des sédiments marins au moment où la température de l'eau élevée, et où l'hydrodynamisme est faible (peu de courants marins) (Ifremer, 2006).



Figure 12 : L'algue *Ostreopsis ovata* (Ifremer, 2001)

Le genre *Ostreopsis* remonte à la surface de l'eau lors de la floraison. (Brescianini *et al*, 2005). Cette algue est ensuite consommée par un poisson herbivore : *Scarus ovifrons*, qui la concentre, d'où un risque d'intoxication par consommation de poisson pour l'homme. Ce poisson étant tropical, il n'y a à priori pas de risque vis-à-vis de cette voie d'intoxication en France métropolitaine actuellement (Taniyama *et al*, 2003).

Ce genre est présent essentiellement entre fin juillet et fin novembre, dans une gamme de température spécifique (13,9 à 29,7°C). Aucune forme végétative n'est retrouvée lors de l'hiver et du printemps (Aligisaki *et al*, 2006).

5.7. Caractéristiques de la toxine :

La palytoxine est une macromolécule complexe poly hydroxylée : $C_{129}-H_{221}-N_3-O_{53}$ (Frémy *et al*, 2001). Sa structure exacte n'est pas établie à l'heure actuelle. Cette toxine serait thermostable (par comparaison à la ciguatoxine).

5.8. Pathogénicité :

Il existe plusieurs types de pathogénicité, selon la voie d'exposition. La première est due à une ingestion de poissons contaminés (sardines, harengs...) et provoque une intoxication appelée Clupéotoxisme. Elle est responsable d'empoisonnements mortels chez l'homme. Le clupéotoxisme est caractérisé par une incubation courte, un syndrome digestif, une tachycardie, des vertiges, une cyanose et parfois un ulcère (la mort ou le coma n'étant pas rares).le mécanisme consisterait en une activation des canaux sodiques qui provoquerait une hémolyse (Frémy *et al*, 2001 et Onuma *et al*, 1999). Le traitement est principalement symptomatique par l'utilisation de vasodilatateurs. La seconde est due à une inhalation de cette toxine transportée par les aérosols marins dans l'atmosphère. Les symptômes sont des problèmes respiratoires. L'ostréotoxine peut également provoquer par contact des démangeaisons, rhinites, irritations oculaires et diarrhées (Ifremer, 2006).

6. Toxines dont la cible moléculaire n'est pas connue :

Les azaspiracides, les pecténotoxines et les yessotoxines ont été mises en évidence il y a moins d'une vingtaine d'années. Bien qu'ayant fait l'objet d'un nombre d'études important, leur cible moléculaire n'a pas encore été clairement identifiée. L'apparition d'effets toxiques chez l'homme ou bien une réponse atypique du bioessai sur souris ont souvent permis de mettre en évidence ces nouvelles familles de toxines.

6.1. Les azaspiracides :

Les azaspiracides (AZAs) sont des polyéthers produits en milieu marin par le dinoflagellé *Azadinium spinosum* (Tillmann *et al*, 2009). Ils ont été mis en évidence en 1995 en Irlande.

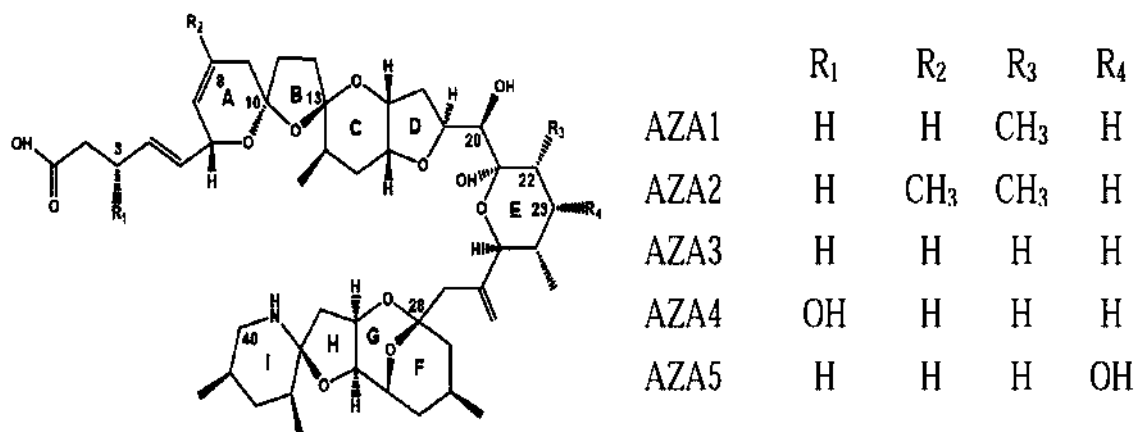


Figure 13: structure des azaspiracides (Frémy et Lassus, 2001).

Une vingtaine d'analogues d'AZAs ont été identifiés mais seuls AZA1 et AZA2 ont été isolés du dinoflagellé producteur, suggérant une métabolisation importante de ces toxines par les coquillages (Rehmann *et al*, 2008).

a. Effets toxiques chez l'homme :

La contamination de coquillages liée ou non à des intoxications humaines a été rapportée dans différents pays dont l'Espagne, la France, l'Irlande, l'Italie, le Maroc, la Norvège, les Pays-Bas, le Portugal et la côte est du Canada (Twiner *et al*, 2008). Les symptômes chez l'homme de l'AZP (Azaspiracid Poisoning) ressemblent à ceux causés par l'AO et incluent des nausées, des vomissements, des diarrhées et des crampes d'estomac (McMahon *et Silke*, 1996). Cinq incidents liés aux AZAs ont été décrits aux Pays-Bas, en Irlande, en Italie, en France et au Royaume-Uni (Twiner *et al*, 2008). Toutefois, au vu de la ressemblance entre les symptômes provoqués par l'AZP et ceux dus à l'AO et ses analogues, il est vraisemblable qu'il y ait une sous-estimation du nombre d'intoxications liées aux AZAs.

6.2. Les pecténotoxines :

Les pecténotoxines (PTXs) sont des polyéthers lipophiles qui s'accumulent dans les bivalves filtreurs en milieu marin.

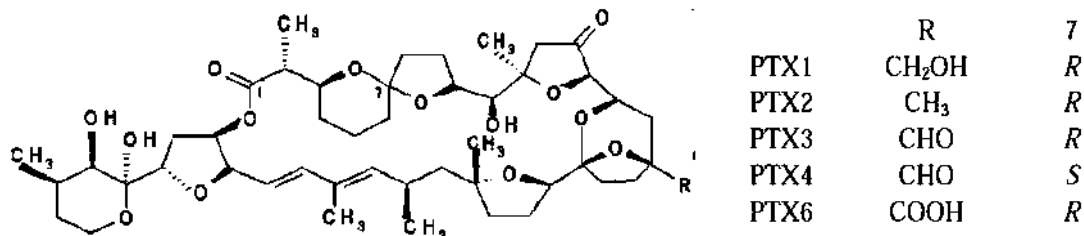


Figure 14 : structure chimique des pecténotoxines (Miles, 2007)

Elles ont été détectées en Australie, au Japon, en Nouvelle-Zélande et dans plusieurs pays européens. Elles sont produites par plusieurs espèces de *Dinophysis* (e.g. *D. acuminata*, *D. acuta*, *D. caudata*, *D. norvegica*) (Dominguez *et al*, 2009). Une quinzaine d'analogues de PTXs ont été caractérisés à ce jour (Miles, 2007). La PTX2 est le précurseur métabolisé dans les coquillages pour donner les différents analogues (Draisci *et al*, 1996 ; Miles *et al*, 2004).

a. Effets toxiques chez l'homme :

Aucun cas d'intoxication humaine n'a été attribué aux PTXs. Toutefois, cette famille de toxines est souvent trouvée en association avec les toxines diarrhéiques (OA et analogues), il est donc difficile de dissocier les intoxications recensées et les toxines responsables (PTXs ou toxines diarrhéiques).

6.3. Les yessotoxines :

Les yessotoxines (YTXs) sont des polyéthers disulfatés structurellement apparentés aux brevétoxines et ciguatoxines (Hess *et al.*, 2007). Elles sont produites en milieu marin par les dinoflagellés *Protoceratium reticulatum*, *Lingulodinium polyedrum* et *Gonyaulax spinifera* (Paz *et al.*, 2008).

La yessotoxine YTX a été isolée au Japon en 1986 à partir de glandes digestives de coquilles Saint-Jacques *Patinopecten yessoensis* (Murata *et al.*, 1987). Une centaine d'analogues d'YTXs ont été isolés à partir d'une souche de *Protoceratium reticulatum* mais l'élucidation de la structure n'a été réalisée que pour quelques-uns d'entre eux (Miles *et al.*, 2005). De plus, comme c'est le cas pour d'autres familles de toxines, les YTXs sont métabolisées dans les coquillages, ce qui contribue à augmenter le nombre d'analogues.

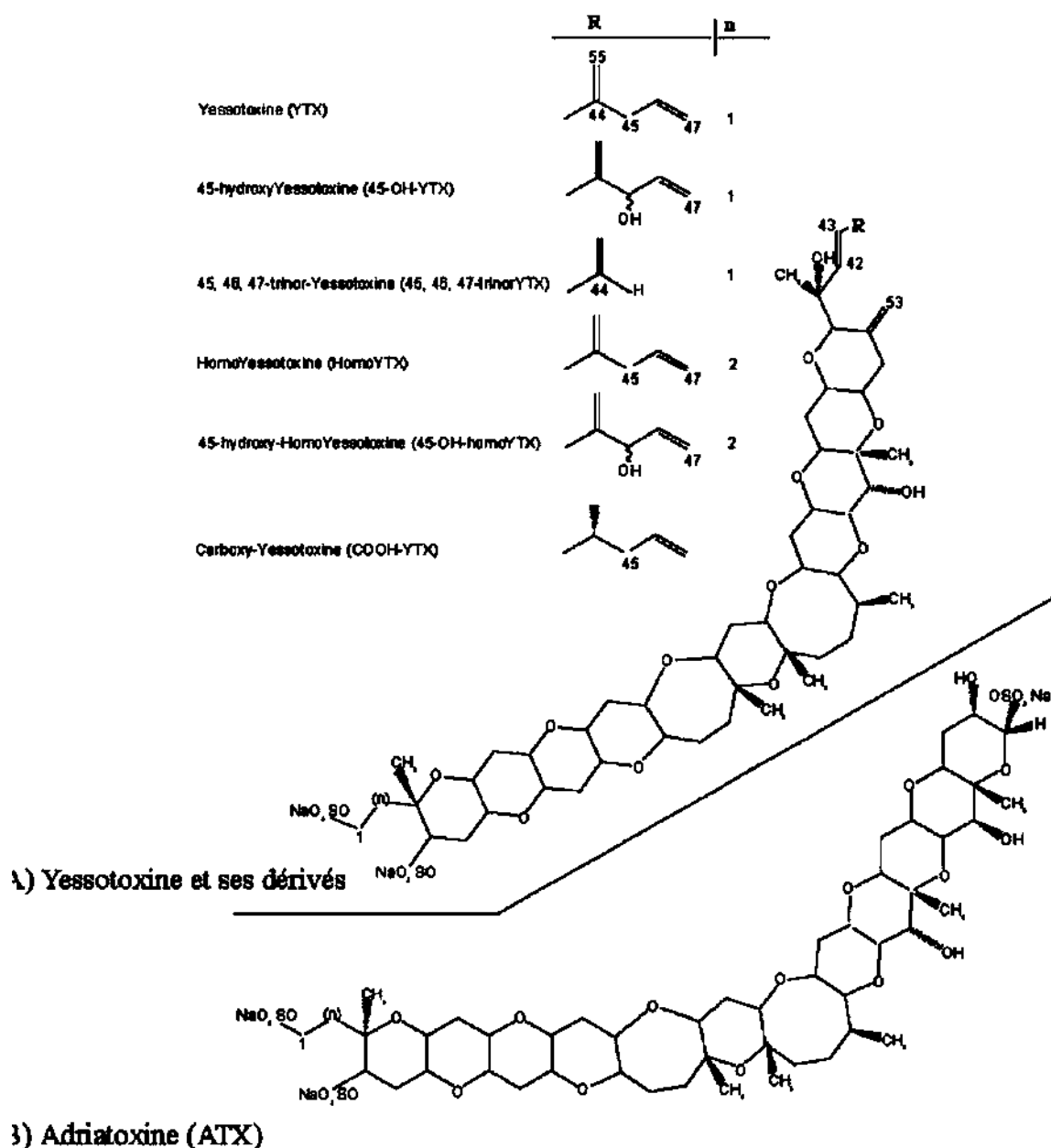


Figure 15: Structure chimique des yessotoxines (d'après Amzil *et al.*,

a. Effets toxiques chez l'homme :

A ce jour, aucun incident connu lié à l'ingestion de coquillages contaminés par les YTXs n'a été répertorié, bien que les YTXs aient été mises en évidence dans divers coquillages parfois à des concentrations élevées en divers endroits du globe (Paz *et al*, 2008).

III. Les Voies d'exposition aux biotoxines :

Il existe trois voies d'exposition aux toxines marines pour l'homme.

III.1. l'ingestion :

L'intoxication par ingestion se fait généralement par consommation de coquillages ou de poissons contaminés. C'est la voie principale d'exposition car les quantités de toxines ingérées et concentrées successivement par les espèces de coquillages et de poissons.

De façon plus marginale, l'ingestion d'eau lors d'activités récréatives peut être une source d'exposition aux toxines marines (Legeas *et al*, 2007).

III.2. l'inhalation :

Les toxines contenues dans le phytoplancton peuvent être libérées lors de la lyse de la cellule, et émises dans le milieu marin. Lors d'activités récréatives dans les zones côtières (promenade, baignades, activité nautique), les toxines peuvent être aéroportées par les embruns et pénétrer ainsi l'appareil respiratoire de l'homme. Plusieurs cas d'intoxication par inhalation de palytoxine (produites par *Ostreopsis*) ont été observés en Espagne et en Italie. Cette voie d'exposition n'est pas négligeable, malgré le manque d'attention que lui portent les autorités sanitaires (Legeas *et al*, 2007).

III.3. Le contact cutané :

Lors d'activité récréative, notamment la baignade, les toxines marines peuvent présenter une toxicité cutanée. Ce phénomène intéresse depuis peu et les scientifiques n'ont pas le recul suffisant pour l'intégrer dans leurs études (Legeas *et al*, 2007).

IV. Normes limites des biotoxines :

Les normes limites de certaines groupes de toxines sont résumées dans le tableau suivant (Afssa, 2006) :

Nom du groupe de biotoxines	Limite maximale/kg de chair de mollusque
Groupe des saxitoxines (STX)	≤0.8 mg (2HCl) d'équivalent saxitoxines
Groupe de l'acide okadaïque (OA)	≤0.16 mg d'équivalent acide okadaïque
Groupe de l'acide domoïque (DA)	≤20 mg d'acide domoïque
Groupe des brevétoxines (BTX)	≤200 unités souris ou équivalent
Groupe de l'azaspiracide (AZP)	≤0.16 mg

II. Méthodes d'analyses :

Pour la détection et la quantification des phycotoxines, la difficulté réside dans le fait que chaque famille de toxines comprend de nombreux analogues de structures moléculaires proches mais de niveaux de toxicité très variables.

Dans le contexte de sécurité sanitaire visant à protéger le consommateur, il est important de pouvoir prendre en compte la toxicité correspondant aux effets toxiques de tous les analogues présents dans un échantillon pour la comparer aux valeurs seuils en vigueur. Depuis de nombreuses années, la sécurité sanitaire du consommateur est donc assurée par une démarche réglementaire basée sur des bioessais sur souris dont l'un des avantages est d'estimer la toxicité *in vivo* d'un échantillon.

D'autres tests fonctionnels basés sur le mode d'action et des techniques d'analyses basées sur la structure moléculaire telle que les techniques physicochimiques et les tests immunologiques ont également été développés.

II.1. Le bioessai sur souris :

Le bioessai sur souris est un test de toxicité aiguë (24 h maximum) qui permet d'estimer une toxicité *in vivo*. Il repose sur l'injection intra-péritonéale d'un ml d'extrait susceptible d'être toxique à un lot de trois à cinq souris. L'observation des symptômes et du délai de survie permet d'identifier le type de toxicité de l'échantillon.

II.1.1. L'extraction des toxines :

Les toxines ne sont pas analysées directement dans l'eau, où elles sont présentes en faible concentration mais dans la chair des coquillages. Il faut donc extraire dans une première étape les toxines de cette matrice. Cette extraction peut se faire à partir des glandes digestives du coquillage ou bien de l'ensemble de la chair du coquillage. Les résultats ne sont donc pas les mêmes suivant la matrice utilisée pour l'extraction. Si l'on ne prend que les glandes digestives on va trouver des concentrations plus élevées que si l'on étudie l'ensemble du coquillage.

a. Méthode d'analyse des toxines diarrhéiques DSP (Diarrhetic shellfish poison) : méthode de bioessai de YASUMOTO *et al*, 1984 modifiée (IFREMER, 2006) :

La recherche des toxines DSP nécessite des tests *in vivo* sur des souris, selon la méthode bioessai de YASUMOTO *et al* modifiée en 2006.

❖ Le protocole :

Cette méthode consiste à :

- extraire, par trois fois 50ml d'acétone, la totalité des composants liposolubles contenus dans 20g d'un broyat d'hépatopancréas (HP), tissu cible accumulateur des toxines de coquillages ;
- la phase acétonique et l'eau résiduelle sont éliminées par évaporation sous vide ;
- puis le résidu lipidique est repris par un volume de solution aqueuse de Tween à 1% (tensio-actif qui permet la solubilisation de la fraction lipidique et l'injection aux souris) de telle manière à obtenir un équivalent de 5g d'hépatopancréas par millilitre de solution injectable ;
- Puis chaque extrait est testé sur trois souris, en leur en administrant 1ml par voie intrapéritonéale (IP) ;
- la toxicité des extraits est évaluée par l'observation des délais de survie des souris, sachant que le critère de salubrité est un critère qualitatif (positif/négatif).

❖ Lecture :

La positivité correspond à la mort d'au moins 2/3 des souris dans le délai de 24 heures.

❖ Toxicité :

Une unité souris (US) est définie comme la quantité de toxine qui provoque la mort d'une souris de 20g en 24h, ce qui correspond à 4 μ g d'AO ou 3,6 μ g de DTX1. Or, les données épidémiologiques disponibles montrent que 10US sont susceptibles de provoquer les premiers symptômes d'intoxication chez l'homme, ce qui correspond à 40 μ g d'équivalent AO ingérés. Il a donc été considéré que 4 μ g d'AO dans 1ml (ou 5g d'HP), soit 0,8 μ g d'équivalent AO/g HP est la limite maximale autorisée, qui est aussi la limite de détection de ce test.

b. Méthode d'analyse des toxines paralysantes PSP (paralytique Shellfish poison) : méthode de bioessai (AOAC international, 1990)

❖ Protocole :

- Les toxines sont extraites par une solution aqueuse acide (HCl : 0,1N) à chaud à partir d'une prise d'essai constituée par 100g d'un homogénat de chair ;
- après homogénéisation, le mélange est porté à ébullition pendant cinq minutes puis refroidi ;
- le volume est complété à 200ml de manière à obtenir un équivalent de 0,5g de chair dans 1ml de solution ;

- après centrifugation, le surnageant est récupéré pour être injecté aux souris (3 souris au minimum).

❖ **Lecture :**

Les souris sont observées pendant une heure afin de noter les symptômes et les temps de survie. Les symptômes vont de signes de nervosité à des convulsions avec sauts ; pour finir la souris se couche sur le côté avec des halètements marqués avant la mort. Le temps de survie de chaque souris est noté.

La valeur médiane est transformée en unité souris (US) en s'appuyant sur un tableau de correspondance. Une US correspond à la quantité de toxine nécessaire pour tuer une souris de 20g en 15minutes. Une correction des US peut intervenir en utilisant un facteur de correction pondéral si le poids des souris ne correspond pas à la gamme tolérée de 19 à 21g.les US sont ensuite transformées en quantité d'équivalent de STX en s'appuyant sur le facteur de conversion déterminé à partir de l'étalonnage des souris par la STX. Enfin, cette quantité est rapportée à 100g de chair de manière à pouvoir la comparer au seuil de salubrité fixé à 80 µg pour 100gde chair.

c. Méthode d'analyse des toxines amnésiantes (IFREMER, 2001) :

Lors du premier épisode d'intoxication humaine provoqué par les phycotoxines amnésiantes qui s'est déroulé en 1987 au Canada, le bioessai sur souris, habituellement utilisé pour la recherche des phycotoxines paralysantes a été appliqué. Compte tenu de la réaction spécifique de type non paralysant observée chez la souris, l'extraction n'a pas été modifiée mais des adaptations ont été apportées pour le test souris proprement dit. Ainsi, le temps d'observation a été rallongé de 15 minutes à 4 heures.

❖ **Protocole et principe :**

Brièvement, le principe de ce test consiste à :

- Réaliser une extraction des phycotoxines amnésiantes par une solution d'acide chlorhydrique 0,1N à chaud ;
- injecter 1ml de cet extrait aqueux à trois souris de 20g, chaque millilitre injecté correspondant à 0,5 g de chair de coquillage.

❖ **Lecture :**

Les souris sont alors observées pendant 4 heures de manière à noter, d'une part, les symptômes qu'elles présentent et, d'autre part, le temps de survie.

Le symptôme le plus représentatif de la présence d'acide domoïque dans un extrait est que les souris se grattent les épaules avec leurs pattes arrière. Selon la dose ingérée, les souris peuvent

aussi être prises de convulsions, faire des mouvements désorganisés et se coucher sur le côté avant de mourir.

❖ Toxicité :

La limite de détection de ce test est de 40 µg d'acide domoïque par gramme de chair. Le seuil de détection étant deux fois plus élevé que le seuil réglementaire (20 µg/g).

d. Méthode d'analyse des toxines neurologique (IFREMER, 2001) :

Actuellement, le seul test reconnu pour la détermination de la toxicité des coquillages en vue de leur mise sur le marché est un bioessai sur souris.

Protocole :

- Extraire les toxines contenues dans un broyat de chair totale de 100 g par de l'éther diéthylique ;
- le résidu sec obtenu après évaporation de l'éther est dissous dans 10ml d'huile de coton de manière à injecter l'équivalent de 10 g de tissus à chaque souris en injectant 1 ml.

❖ Lecture :

Les souris sont observées pendant six heures en continu puis chaque heure entre 6 et 15 h (Dickey *et al*, 1999 ; Apha, 1985).

En présence de toxines, les souris présentent les symptômes suivants : immédiatement après l'injection IP, les souris montrent des signes d'irritabilité, suivis par une paralysie des pattes arrière, une sévère dyspnée et des convulsions avant la mort par paralysie respiratoire (Baden, 1989, cité par Ishida *et al*, 1995).

e. Méthode d'analyse des ciguatoxines :

Ce bioessai fut l'un des premiers utilisé avec succès par Banner *et al* (1961) pour mettre en évidence la présence de ciguatoxines dans les tissus de poissons ciguatériques. Il nécessite la préparation d'un extrait brut lipophile et son injection intrapéritonéale (IP) aux souris. La méthode a été décrite par Yasumoto *et al* (1984). Elle faisait suite à la description exhaustive de ce bioessai par Hoffman *et al* (1983). Elle a ensuite été actualisée selon un protocole toxicologique précis applicable à 50, 100 ou 200 g de poisson de toxicité inconnue avec utilisation respective de 2, 6 ou 12 souris (Vernoux, 1994). Du point de vue de l'hygiène alimentaire, et par souci de simplicité et d'économie, c'est le test utilisant 50 g de chair de poisson qui est préféré.

CHAPITRE II : TECHNIQUES D'ANALYSE

Protocole :

Chair crue mixée (50 g)

Extraction au méthanol (100 ml)
Homogénéisation pdt 3 min
Filtration

Filtrat hydrométhanolique (=170 ml)

Ajouter du n-hexane (170 ml)
Agitation 1 min dans une ampoule à décanté

Filtrat hydrométhanolique lavé

Ajouter de l'eau distillée (170 ml) et mélanger
Extraction de phase hydrométhanolique par l'éther diéthylique
(2 fois 340 ml)

Phases étherées

Evaporation à sec au Rotavapor

Résidu

Ajouter du méthanol 80 % (2 ml)
Ajouter du n-hexane (2 ml)
Agitation, récupération

Résidu liposoluble

Repris dans 2ml de Tween 60 1% à 37°C et agitation

Injection

À 2 souris (18 à 24 g) à la dose : 0,04 ml /g de souris (c'est-à-dire une dose correspondant à un équivalent gramme de chair de poisson par gramme de souris) ;

Observer pendant 24h et noter les décès éventuels et/ou peser les survivants ; interpréter la comestibilité selon les résultats (IFREMER, 2001):

Mortalité observée après injection de 1g éq chair/g de souris	Concentration toxinique dans la chair	Perte de poids à 24h (> 5%)	Interprétation
2/2	≥ 1 USg/g éq chair	Non	Non comestible
1/2	0,5 à 1USg/g éq chair	Oui	Non comestible
0/2	$<0,5$ USg/g éq chair	Oui Non	Frontière comestible

Figure 16: protocole d'analyse des ciguatoxines par la méthode de bioessai sur souris (Frémy *et* Lassus, 2001).

II.2. Techniques d'analyses basées sur la structure moléculaire :

A côté des méthodes reposant sur le concept du mode d'action des toxines sur les organismes vivants (biologique), d'autres méthodes basées sur la structure moléculaire des toxines sont aussi mises au point, dans le but non seulement de repérer et/ou de quantifier mais encore d'identifier les phycotoxines dans les produits marins. Pour cela deux approches techniques sont menées : une approche utilisant les caractéristiques physiques et chimiques de la molécule, dite « **physicochimique** », et une approche utilisant la reconnaissance d'anticorps vis-à-vis de la molécule, dite « **immunologique** » (Frémy *et* Lassus, 2001).

II.2.1. Techniques physicochimiques :

La détection des toxines par les techniques physicochimique est basée sur leur isolement avec les autres molécules environnantes de la matrice du produit. Ces techniques séparatives incluent les techniques de chromatographie et d'électrophorèse. Une fois la séparation effectuée, le repérage de la toxine ou détection peut s'opérer. Pour cela, les techniques physicochimiques sont utilisées, capable de quantifier les molécules et faisant appel le plus souvent à la spectrométrie soit d'absorption UV, soit d'émission de fluorescence, soit de masse (Frémy *et* Lassus, 2001).

II.2.1.1. Méthodes chimique d'analyse par CLHP (Chromatographie liquide à haute performance) :

Au fur et à mesure que l'identification et la purification de ces toxines ont progressé, les analyses chimiques se sont perfectionnées et ont permis une caractérisation quantitative des toxines ainsi qu'une calibration des tests biologiques. La détection est faite grâce aux propriétés de solubilité des toxines, ainsi que sur leur comportement chromatographique. Dans la détection chimique, les toxines se couplent à un marqueur ou s'oxydent, afin de les rendre fluorescentes (Abou Abdellah, 2012).

❖ Le dosage des toxines paralysantes :

La méthode consiste à extraire les toxines dans un milieu acide, à les séparer par chromatographie liquide à phase inversée, puis à faire une dérivation par oxydation post colonne en milieu alcalin et une quantification par fluorimétrie. Cette méthode est applicable sur tous les coquillages bivalves (Abou Abdellah, 2012).

❖ Le dosage des toxines diarrhéiques :

Le principe de l'analyse des toxines diarrhéiques (Acide okadaïque ou la DTX1) s'inspire de la méthode du dosage des acides gras par fluorescence (CLHP). C'est un test précis (10%).

Il est plus sensible que la méthode biologique, et permet d'obtenir le profil toxinique des phycotoxines étudiées (Abou Abdellah, 2012).

II.2.1.2. Analyses chimiques par la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (CL-SM/SM) :

La LC-MS/SM est basée sur un couplage entre la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse en tandem.

La chromatographie en phase liquide (liquid chromatography, LC) est une technique d'analyse quantitative, qualitative et séparative. Ce type de chromatographie repose sur la séparation de composés entraînés par un liquide (phase mobile) à travers un solide (phase stationnaire) qui est placé dans une colonne chromatographique.

La spectrométrie de masse (mass spectrometry, MS) est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse, et de caractériser leur structure chimique. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z).

L'utilisation de la LC-MS/MS pour la détection et la quantification des toxines lipophiles a progressé rapidement et un nombre croissant de scientifiques considèrent que cette technique est un moyen efficace comme méthode alternative au test souris puisqu'elle garantit plus de sélectivité, de sensibilité, de fiabilité et de rapidité (Amandi *et al.*, 2002; Ciminiello *et al.*, 2002; Holland *et al.*, 2002; Hess *et al.*, 2003; Vale, 2004; Mac Nabbet *et al.*, 2005; Stobo *et al.*, 2005; Hashimoto *et al.*, 2006).

II.2.1.3. Electrophorèse capillaire :

L'électrophorèse capillaire (EC) est une technique prometteuse dont les applications, bien que récentes, sont nombreuses. Cette technique offre des avantages non négligeables tels que des temps d'analyse faible, des possibilités d'automatisation, des volumes d'injection (et donc des quantités de matériel) réduits, l'emploi de tampon au lieu de solvant nocifs et un grand nombre de paramètres sur lesquels il est possible d'agir (température, pH et concentration du tampon, potentiel d'électrophorèse ; diamètre et longueur des capillaires, nature des parois...) (IFREMER, 2001).

Le principe de séparation est basé sur le rapport taille/charge des espèces chimiques soumis à un champ électrique. L'appareillage est constitué de deux récipients, remplis d'une solution électrolyte tamponnée, dans lesquelles trempent les extrémités d'un tube capillaire (\varnothing interne entre 25 et 75 μm) ainsi que deux électrodes de platine. Le mélange à analyser est injecté par pression dans le capillaire, puis une tension de plusieurs kilovolts est appliquée entre les deux électrodes. Le champ électrique ainsi créé induit un mouvement des molécules et permet la

séparation de celles-ci. On détecte le passage des molécules à travers le capillaire à l'aide d'un détecteur UV. Lorsqu'une molécule passe, elle absorbe une certaine quantité de lumière et le détecteur transcrit cette information en un signal, visible sous forme de pic dans un Electro-chromatogramme (Fribourg, 2008).

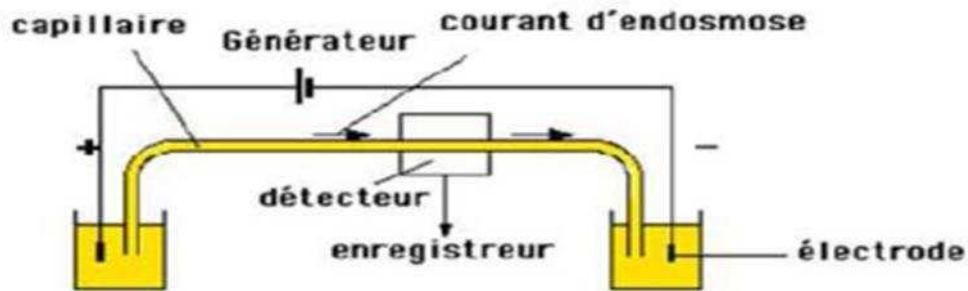


Figure 17 : schéma d'une électrophorèse capillaire (Fribourg, 2008)

❖ les toxines diarrhéiques

Belin *et al* (1996) proposent une technique très performante de couplage de l'électrophorèse capillaire, avec détection UV, avec une séparation en chromatographie liquide et un test d'inhibition des protéines phosphatases. Cette technique permet d'abaisser le seuil de détection à 100 pg d'AO injectés. Une technique de chromatographie électrocinétique micellaire, l'une des variantes de l'électrophorèse capillaire faisant intervenir des interactions hydrophobes entre la toxine et des micelles de dodécyle sulfate de sodium, a permis d'abaisser ce seuil à 40 pg et de détecter des concentrations équivalentes à 10 ng/g de chair de coquillages (Bouaicha *et* Maatouk., 1997).

II.2.2. Techniques immunologiques :

Ces méthodes sont basées sur une reconnaissance structurale des toxines par des anticorps ; le couplage de l'anticorps avec un chromophore permet leur détection. Différents formats sont commercialisés actuellement. Une méthode ELISA a été officiellement validée pour la détection de l'acide domoïque (méthode AOAC 2006.02) et son utilisation est officiellement autorisée dans l'Union européenne à des fins de dépistage (Ledreux, 2010).

II.2.2.1. La méthode d'ELISA :

ELISA est le sigle anglais pour Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay. Ce terme regroupe les tests utilisant un marqueur enzymatique lié de façon covalente à un anticorps ou à un antigène. A partir d'un substrat chromogène, incolore, spécifique de l'enzyme couplée, celle-ci est capable de catalyser une réaction générant un produit coloré. La densité optique (DO) est proportionnelle à la quantité de substrat ayant réagi. (Baco, 2011)

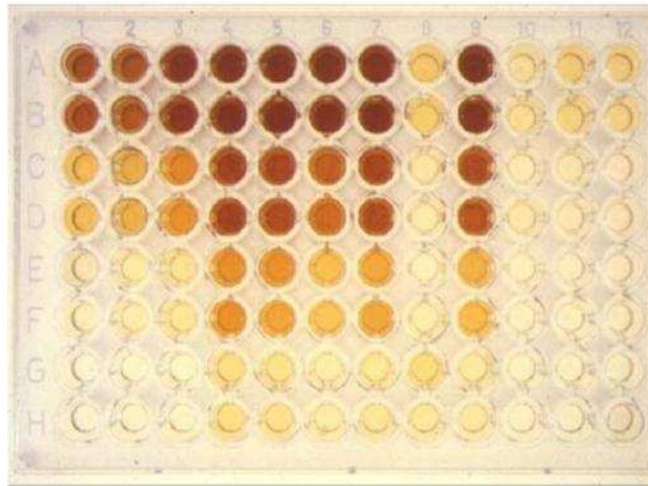


Figure 18 : Plaque de microtitration (Baco, 2011)

Le principe d' ELISA :

Les tests ELISA sont réalisés sur des plaques de micro-titration de 96 puits. Ces tests se font en plusieurs étapes. Dans le cas d'un test **ELISA direct**, la procédure est la suivante :

- Dans un premier temps, l'antigène est déposé sur un support solide (généralement une plaque de micro-titration) ;
- l'antigène est reconnu par un anticorps marqué par une enzyme.
- les anticorps en excès, non liés à l'antigène, sont éliminés lors de l'étape de rinçage ;
- l'ajout du substrat permet la réaction colorée dont la DO mesurée est proportionnelle à la quantité d'antigène fixée sur le support solide (Baco, 2011).

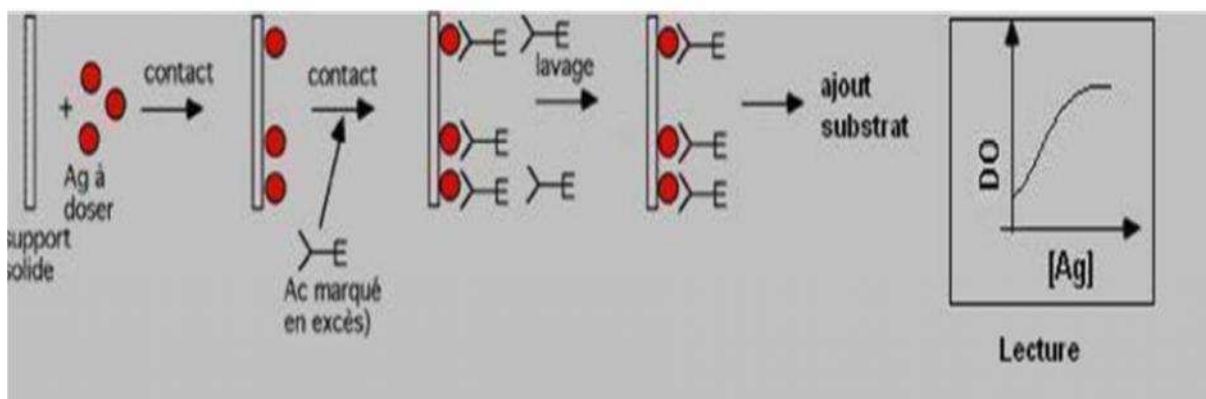


Figure 19 : ELISA direct (Baco, 2011)

CHAPITRE II : TECHNIQUES D'ANALYSE

Tableau 02 : avantage et inconvénient des différentes méthodes d'analyse des biotoxines (anonymes a).

Test	Avantages	Inconvénients
Bioessai sur souris	<ul style="list-style-type: none"> • Méthode simple à réaliser et à interpréter • Elle permet de détecter des toxines émergentes potentiellement toxiques pour l'homme 	<ul style="list-style-type: none"> • Faible spécificité et difficultés liées à la variabilité inhérente à l'utilisation des animaux. • Résultats « faux positifs » : la présence de substances qui sont toxiques chez la souris par voie intra péritonéale, mais pas toxiques chez l'homme par voie orale (en terme de toxicité aigüe). • Risque de sous-estimation de la toxicité des produits de la mer.
Les méthodes physicochimiques	<ul style="list-style-type: none"> • Elles permettent l'identification formelle des différentes phycotoxines avec une grande sensibilité et grande spécificité. • Elles permettent la séparation et la quantification des toxines individuellement. • L'électrophorèse capillaire (EC) est une technique séparative plus récente que la Chromatographie Elle se caractérise par un grand pouvoir de séparation, une excellente sensibilité, et par la possibilité de quantifier aussi bien les petites molécules que les biomolécules pour lesquelles la CLHP est beaucoup moins performante. 	<ul style="list-style-type: none"> • Les méthodes physicochimiques 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. • Elles ne ciblent que celles pour lesquelles un étalon est disponible. Elles ne permettent pas de détecter et quantifier de nouveaux analogues ou de nouvelles toxines. • Elles ne donnent pas d'indication sur le niveau de toxicité.
Techniques immunologiques	<ul style="list-style-type: none"> • L'utilisation d'anticorps monoclonaux rend la détection spécifique. • Possibilité de quantifier grâce à la réalisation d'une gamme en parallèle. • L'utilisation d'anticorps secondaires rend la technique sensible. • technique accessible à tous les biologistes. • La détection du signal ne nécessite pas la présence d'appareillage spécialisé. 	<ul style="list-style-type: none"> • Cette technique présente un coût très élevé, surtout pour le traitement de nombreux échantillons. • La limite de détection est moins bonne que la technique RIA. • La réaction enzymatique rend cette technique dépendante de la température, du pH et de l'éclairement

RÉSULTATS

Afin de veiller et de protéger la santé publique notamment celle du consommateur plusieurs réseaux et laboratoire de surveillance des phycotoxines marines ont été développés, en vue de l'augmentation des épisodes toxiques ces dernières années.

III.1. Résultats de réseau des phytoplanctons et phycotoxines (REPHY) :

III.1.1. Réseau REPHY:

Créé par l'Ifremer en 1984 pour la surveillance du phytoplancton et des phycotoxines dans les zones de production, il est monté progressivement en puissance pour intégrer la prévention de nouveaux risques liés aux toxines (paralysantes, amnésiantes, lipophiles et les émergentes).

Il est l'un des premiers dispositifs européens mis en place pour prévenir le risque d'intoxication alimentaire par les phycotoxines. A ce titre, il a servi de référence pour l'élaboration de dispositifs dans d'autres pays.

LE REPHY possède donc un double aspect patrimonial et réglementaire, puisque la constitution de séries temporelles de données sur les populations phytoplanctoniques des différentes façades maritimes (aspect patrimonial), permet également la détection des espèces phytoplanctoniques particulières qui sont toxiques et nuisibles. Le suivi de ces épisodes de toxicité détermine la prise de décision administrative ; cet aspect réglementaire est désormais étroitement lié à des obligations communautaires (Belin *et al*, 1998).

▪ ***Dinophysis* et toxines de la famille de l'acide okadaïque et des pecténotoxines :**

Depuis que le REPHY existe (1984), le schéma de développement de *Dinophysis* dans les eaux côtières est assez stable : il est observé tous les ans en baie de Seine, sur la côte du Cotentin, en Bretagne ouest et sud, et dans les lagunes méditerranéennes du Languedoc-Roussillon et de Corse. Il est par contre beaucoup moins présent sur le littoral du nord de la France, de l'ouest Cotentin et de Bretagne nord.

Les résultats de contamination des coquillages par les toxines de la famille de l'acide okadaïque et des pecténotoxines pour l'année 2010 (Figure 18) suivent ce schéma global, avec une configuration relativement similaire aux années précédentes. Ainsi, on peut observer une toxicité des coquillages presque tous les ans en baie de Seine, en Bretagne ouest et sud, dans le bassin d'Arcachon, dans l'étang de Salses Leucate en Languedoc-Roussillon, et dans les étangs corses de Diana et Urbino. A noter que les concentrations en toxines ont été très fortes (jusqu'à 20 fois le seuil réglementaire pour la famille de l'AO) en 2010 sur plusieurs espèces de coquillages en Bretagne.

RÉSULTATS

Les périodes de toxicité sont différentes selon les régions, et elles sont liées aux périodes de développement de *Dinophysis* : généralement à partir de mars-avril en Bretagne ouest et sud, à partir de juillet-août en Normandie, toute l'année en Méditerranée.

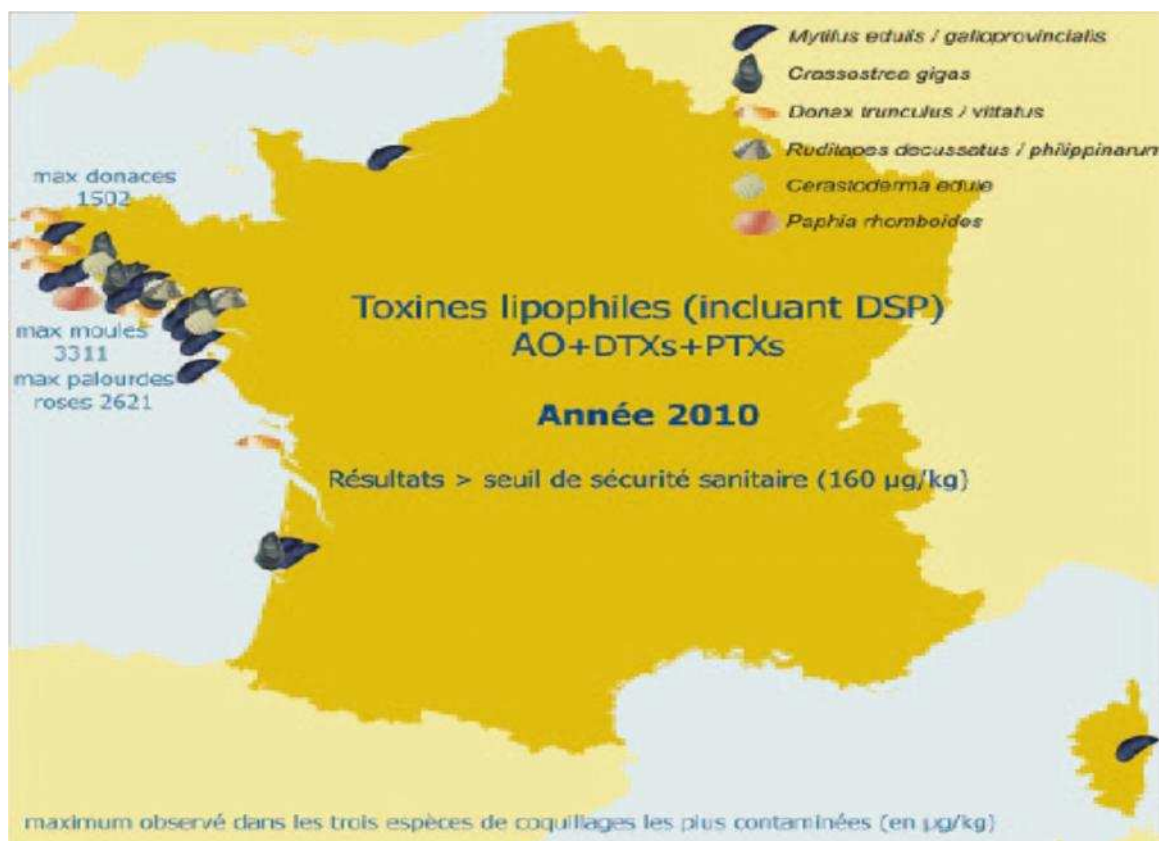


Figure 20: Zones et coquillages contaminés en 2010 par des toxines lipophiles appartenant au groupe AO+DTXs+PTXs (acide okadaïque + dinophysistoxines + pecténotoxines). Résultats des analyses chimiques par CL-SM/SM (en µg d'équ. AO+PTX2/kg) (REPHY, 2010)

▪ **Alexandrium et toxines de la famille de la saxitoxine (ex-paralysantes, PSP) :**

Alexandrium peut être observé sur l'ensemble du littoral français, mais il ne prolifère que sur certaines zones, avec des configurations très variables d'une année à l'autre. Ainsi, les deux principaux sites sur lesquels étaient recensées des concentrations élevées dans les années 1990 et au début des années 2000, c'est-à-dire l'estuaire de la Penzé en Bretagne nord-ouest, et l'étang de Thau en Languedoc, ne sont plus affectés par des proliférations importantes depuis quelques années. Ces données sont cohérentes avec celles sur les toxines PSP qui ne sont pratiquement plus observées en France depuis 2005.

Les résultats (Figure 19) montrent que deux zones seulement ont été touchées en 2010, avec des épisodes toxiques très courts et des concentrations en toxines de l'ordre de quatre fois le seuil réglementaire. Par comparaison, la décennie précédente avait connu des épisodes

RÉSULTATS

toxiques avec des niveaux de contaminations plus importants dans les coquillages, par exemple :

- ✓ en Bretagne nord-ouest (Abers et baie de Morlaix) : 7 000 μ g/kg dans les huitres en 2001,
- ✓ dans la Rance (Bretagne nord) : 3 300 μ g/kg dans les coques en 1998,
- ✓ dans l'étang de Thau : de 3 000 à 6 000 μ g/kg dans moules, huitres, palourdes entre 2001 et 2004.

A noter que les toxines de la famille de la saxitoxine ont été observées pour la première fois en France en 1988, et que depuis cette date, les épisodes toxiques ont toujours lieu en été en Bretagne, et en automne-hiver en Méditerranée.



Figure 21 : Zones et coquillages contaminés en 2010 par des toxines de la famille de la saxitoxine (PSP). Résultats des bioessais sur souris (en μ g d'équ. STX/kg) (REPHY, 2010).

RÉSULTATS

- *Pseudo-nitzschia* et toxines de la famille de l'acide domoïque (ex-ammésiantes, ASP) :

Pseudo-nitzschia est observé tous les ans sur l'ensemble du littoral français, avec des concentrations maximales annuelles très importantes.

La première observation en France de toxines de la famille de l'acide domoïque date de 2000, et les épisodes toxiques ont affecté majoritairement les coquilles St-Jacques et les pétoncles jusqu'en 2009: tous les ans en Bretagne ouest et sud (rade de Brest et baie de Quiberon - Belle-Île), et en baie de Seine en 2004-2005. Pendant cette période, certains autres coquillages furent occasionnellement affectés, par exemple en Bretagne ouest et sud (palourdes roses, donaces), ou sur la côte du Languedoc-Roussillon en 2006, avec des concentrations maximales comprises entre 20 et 80 mg/kg. Les résultats pour l'année 2010 (Figure 20), sont par contre tout à fait atypiques par rapport à ceux des années précédentes, avec une nouvelle région touchée (Pertuis charentais), une grande diversité de coquillages contaminés, et des records de concentrations en toxines (jusqu'à 213 mg/kg dans les coquilles St-Jacques). De façon générale, les périodes et durées de toxicité sont différentes selon les espèces de coquillages : période hivernale avec une durée potentiellement très longue (plusieurs mois) pour les coquilles St-Jacques, entre mars et mai et durée plus courte pour les autres coquillages.



Figure 22 : Zones et coquillages contaminés en 2010 par des toxines de la famille de l'acide domoïque (ASP). Résultats des analyses chimiques par CL-UV (en mg d'équ. AD/kg) (REPHY, 2010).

- ***Ostreopsis et palytoxines :***

Ostreopsis est observé essentiellement sur la côte Méditerranéenne et en Corse, majoritairement entre juin et septembre, avec des concentrations qui semblent augmenter sur la période 2006-2008. Outre les interdictions de baignade prises par précaution sur deux plages en 2008 (épisodes suivis par les organismes de santé), des palytoxines ont été détectées pour la première fois en France dans des organismes marins du littoral de Marseille et de Ville franche: oursins en 2008, puis oursins et moules en 2009.

Un bloom en Ligurie (Italie) d'*Ostreopsis ovata* en juillet 2005 a eu pour conséquence l'hospitalisation de 80 personnes (irritation de la peau et des yeux, trouble respiratoires et gastriques) après inhalation des embruns et des effets sanitaires ont été enregistrés sur le pourtour méditerranéen depuis 2002 et en Italie du sud, mi-août 2003 et début septembre 2004.

III.2. Résultats obtenus par le Laboratoire Environnement Ressources du Languedoc Roussillon en 2011 (IFRMER, 2012) :

- Sur l'étang de Salses-Leucate, l'abondance du phytoplancton potentiellement toxique suit la tendance enregistrée ces dernières années. Les périodes de présence de *Dinophysis* et *Alexandrium minutum* dans la colonne d'eau sont plus restreintes. En 2011, il n'y a pas eu de contamination avérée par les toxines algales sur cette zone. Les toxines lipophiles (DSP) sont présentes en faible quantité dans les huîtres en novembre et décembre et les moules en avril et mai. Les toxines paralysantes (PSP) n'ont pas été détectées en 2011.
- Sur l'étang de Thau, les biomasses et abondances de phytoplancton mesurées sont du même ordre que celles observées les années précédentes. L'algue *Pseudo-nitzschia* est la plus représentée. Malgré les abondances importantes de *Pseudo-nitzschia*, aucune toxicité ASP n'a été mise en évidence dans les coquillages, à l'exception de traces d'acide domoïque dans les moules au mois de mai. On observe depuis quelques années la présence de *Dinophysis* dans l'étang, en particulier. Néanmoins, aucune toxicité DSP n'a été mise en évidence en 2011 dans les coquillages. Seules des traces de toxines lipophiles ont été détectées en mai et juin. Régulièrement depuis 1998, *Alexandrium* est observé au printemps et à l'automne dans l'étang de Thau. En 2011, les efflorescences ont été modérées dans les tables conchylicoles et n'ont donc pas conduit à la recherche de toxines paralysantes (PSP) dans les coquillages.

RÉSULTATS

- Concernant l'étang de Vic, ce dernier a été fermé en novembre et décembre 2011 pour cause de présence de toxines DSP en concentration supérieure au seuil de toxicité sanitaire.

III.3. Résultats de la faculté des sciences d'Agadir (Abouabdellah , 2012):

Une étude des phycotoxines paralytiques et lipophiles chez les mollusques bivalves au niveau de trois régions de l'Atlantique sud marocain (Agadir, Laâyoune et Dakhla) par Rachid Abou Abdellah en 2012 à la faculté des sciences d'Agadir à montrer :

- **Les Toxines lipophiles dans les moules des trois régions de 2008 jusqu' à 2011 :**

Les analyses biologiques des phycotoxines lipophiles réalisées 2008 jusqu'à 2011 dans les glandes digestives des moules des trois régions a révélé la présence de ces toxines algales durant les quatre saisons.

-A Dakhla, l'apparition de ces toxines a été notée en été 2008 et en hiver 2009 (Figure 21A).

-A Laâyoune, ces toxines ont été enregistrées durant l'automne de 2010 et au printemps et automne 2011 (Figures 21B).

-A Agadir, ces toxines algales ont été détectées durant les périodes automnales de 2008, 2009, 2010 et 2011 et printanière de 2011 (Figures 21C).

- **Les toxines PSP des trois régions de 2003 jusqu' à 2007 :**

Le suivi régulier des toxines PSP au niveau des gisements coquilliers a montré une manifestation annuelle de ces dernières durant les périodes chaudes estivales à Agadir et Laâyoune et automnales à Dakhla. Les taux de ces neurotoxines n'ont dépassé les normes établis au Maroc qu'à une seule reprise. Cette toxicité a été plus accentuée chez les espèces fouisseuses, notamment le couteau, que les bivalves filtreurs.

RÉSULTATS

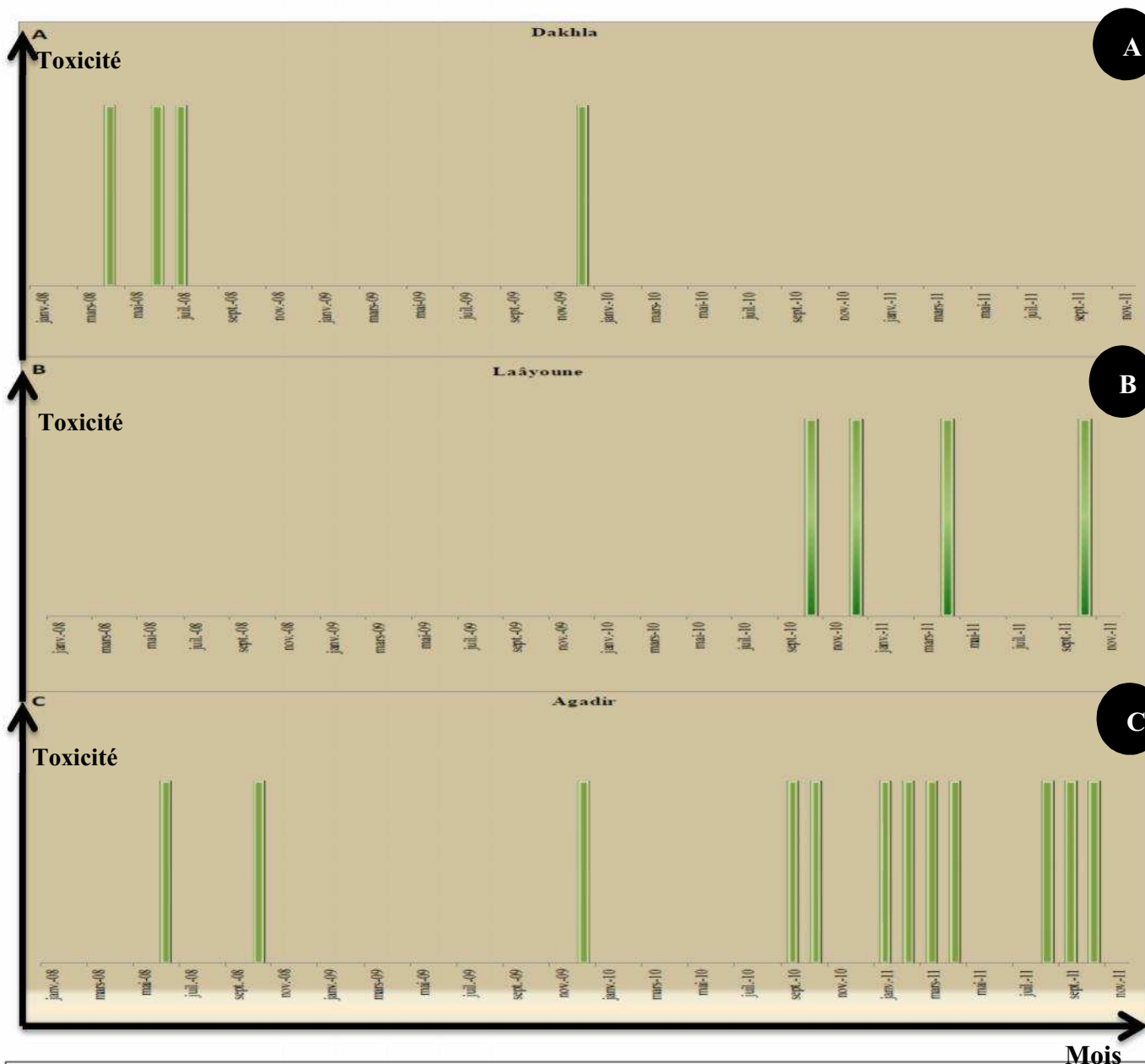


Figure 23: Toxicité LSTs dans les moules de Dakhla (A), de Laâyoune (B) et d'Agadir (C) (Abouabdellah, 2012).

III.4. les résultats obtenus au niveau de l'ENSSMAL en 2012 :

Une analyse toxicologique par la méthode de bioessai sur des souris a été réalisée sur des moules d'élevage prélevées au niveau de la ferme « ORCA marine » sur la plage de « Ain Chrob » de la commune d'Ain Taya wilaya d'Alger.

Les résultats obtenus ont montré la présence de la toxine diarrhéique **DSP** en raison de la mort des trois souris injectées durant les 5h d'observation recommandée et aussi une

RÉSULTATS

présence de la toxine paralysante **PSP**, ce qui implique la contamination de la zone de prélèvement par une pollution biologique (Radja et Bouich, 2012).

II.4. La crise du bassin d’Arcachon (REPHY, 2007) :

Des analyses ont été effectuées sur des huitres prélevées le 28 Août 2006 dans le bassin d’Arcachon. Les tests réalisés par le laboratoire Ifremer de la Tremblade ont révélé que la toxicité des huitres dépassait les seuils sanitaires d’interdiction. Plus concrètement, deux des trois souris utilisées lors de test sont mortes après injection d’extrait de glandes digestives d’huitre par voie péritonéale. Le test n’étant pas spécifique, la cause des décès n’a pu être déterminée. Les analyses chimiques et biologiques complémentaires n’ont révélés ni la présence de *Dinophysis* dans les eaux du bassin d’Arcachon, ni la présence de toxines connues dépassant les seuils réglementaire.

Le 31 Août 2006, la vente d’huitres et de moules provenant du bassin d’Arcachon a été interdite par arrêté préfectoral au nom du principe de précaution. En plus de la surveillance des huitres, les médecins de l’hôpital d’Arcachon ont déclaré la mort de deux personnes le 3 et 5 Septembre 2006 pour causes inconnues. Ces deux personnes auraient consommé des huitres du bassin.

Le 22 Septembre 2006, l’interdiction de commercialisation est levée car les tests biologiques sur les huitres n’ont pas montré de signe négatif depuis deux semaines.

Le 31 Novembre 2006, les huitres du bassin d’Arcachon ont été mises hors de causes par l’enquête de justice dans le cas des deux morts suspectes de Septembre 2006.

CONCLUSION

Conclusion :

Les intoxications causées par les phycotoxines ont pris depuis quelques années une importance considérable. Ce phénomène est largement lié à l'augmentation du nombre de zones géographiques touchées ainsi qu'à la diversification des espèces toxigènes et à l'identification de nouveaux composés toxiques.

Vu les risques sanitaires et le danger public que représentent ces toxines algales, le meilleur moyen pour prévenir est le contrôle régulier des milieux et les produits concernés par des méthodes biologiques, physicochimiques et immunologiques.

Cependant, ces dernières présentent des inconvénients et des avantages. Malgré la rapidité et la sensibilité des tests physicochimiques et immunologiques par rapport aux bioessais sur souris ; ces derniers restent très onéreux. Le test de bioessai reste suffisamment fiable et bon marché pour la surveillance de certaines phycotoxines.

En perspective ; il serait intéressant de prendre en considération les propositions suivantes:

- ✓ La recherche fondamentale doit être développée autour des problématiques liées à la production de phycotoxines et à leur accumulation dans les coquillages, mais également sur le risque chronique. En effet, ce risque pourrait s'avérer important en terme d'impact car certaines personnes ont une consommation très régulière de coquillages (populations défavorisées sur le littoral, professionnels de la conchyliculture) ;
- ✓ Exiger le contrôle de la marchandise nationale et d'importation avant de la mettre à la disposition du consommateur ;
- ✓ Il faut sensibiliser les médecins à l'importance de déclarer une intoxication liée aux toxines marines quand elle est repérée. La population doit également être mieux informée des symptômes associés à ces intoxications ;
- ✓ Une communication plus efficace des professionnels de santé sur les dangers qu'engendrent les phycotoxines marines serait nécessaire.

Le fond du message pourrait être le suivant : le risque zéro n'existe pas. Il est sans doute plus pertinent de communiquer ce message objectif plutôt que d'essayer de rassurer la population en expliquant qu'il n'y a aucun risque.

BIBLIOGRAPHIE

- ABOUABDELLAH R., 2012. *Etude des phycotoxines paralytiques et lipophiles chez les mollusques bivalves de l'Atlantique sud marocain*. TH. DOC. URF: Ecosystèmes Marins et Dulçaquicoles Environnement et Ressources Biologiques. ed. Maroc. P 153.
- ALIGIZAKI K, NIKOLAIDIS G, 2006. *The presence of the potentially toxic genera *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) in the North Aegean Sea, Greece*. Harmful Algae 5: 717-730.
- AOAC, 1990. *Paralytic shellfish poison. Biological method. Final action*. In : Official methods of analysis. 15th Edition. Hellrich K. (ed.) Association of Official Analytical Chemists, Arlington, sect.959.08,881-882.
- AMZIL Z. ; VERNOUX JP. ; PORTTIER I., 2001. *Les principales classes de phycotoxines*. In : FREMY JM et LASSUS P., *Toxines d'algues dans l'alimentation*. Ed. Paris: Ifremer. 10 - 30 p.
- APHA, 1985. *Method for *Ptychodiscus brevis* toxins*. In: laboratory procedures for the examination of seawater and shellfish. 5th Edition. American Public Health Association Inc., Washington DC, 64-80.
- ARTIGAS ML, VALE PJV, GOMES SS, BOTELHO MJ, RODRIGUES SM, ARNORIM A, 2007. *Profiles of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish from Portugal explained by carbamoylase activity*. Journal of Chromatography A 1160:99-105.
- BACO Etienne, 2011. *Synthèse d'haptènes de phycotoxines pour l'élaboration d'un immunocapteur*. TH. DOC. Université bordeaux I. Ecole doctorale des sciences chimiques. N° d'ordre : 4260.
- BADEN DG. et ADAMS DJ., 2000. *Brevetoxins: chemistry, mechanism of action, and methods of detection*, In: Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology and detection. Botana LM (Ed), Marcel Dekker, New York, p. 505-532.
- BAYLET René ; ELZIERE Panayota et GUYONNET Jean-Paul, 2004. *Pathologie attribuables à la consommation de coquillages*, In revue Française des Laboratoire.
- BAGNIS R.; SPEIGEL A.; NGUYEN L. et PLICHART R., 1992. *Public health epidemiological and socioeconomic patterns*, In: FREMY Jean-Marc et LASSUS Patrick, 2001. *Toxines d'algues dans l'alimentation*. Ed. Paris: Ifremer. 552 p. ISBN 2-84433-052-5.

BIBLIOGRAPHIE

- BELIN C. et RAFFIN B., 1998. *Les espèces phytoplanctoniques toxiques et nuisibles sur le littoral français de 1984 à 1995*, résultats de REPHY. Ed. Ifremer.
- BELIN C. ; MARCAILLOU-LE BAUT C. ; AMZIL Z. et LEDOUX M., 1996. Réphy. Méthodes de détection des phycotoxines diarrhéiques et paralysantes. Rapp. Intern. Ifremer, Del, 96-17, 28p.
- BERTRAND Nicolas ; CATHALA Delphine et DELAHAIE Sophie, 2007. *Atelier Santé et Environnement : Les toxines marines sur le littoral français, état des connaissances* : Formation ingénieurs de génie sanitaire. Ed. Paris. 54 p.
- BIALOJAN C., Takai A., 1988. *Inhibitory effect of a marine sponge toxin, okadaik acid, on protein phosphatases, Specificity and kinetics*. 25(1), p. 283-290.
- BOUAICHA N. et MAATOUK I., 1997. Université Paris Sud, faculté de pharmacie. In : FREMY Jean-Marc et LASSUS Patrick, 2001. *Toxines d'algues dans l'alimentation*. Ed. Paris: Ifremer. 552 p. ISBN 2-84433-052-5
- BLANCO J.; REYERO I. et FRANCO J., 2003. *Kinetics of accumulation and transformation of paralytic shellfish toxins in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis**. *Toxicon* 42:777-784.
- BRICELJ VM. et SHUMWAY SE., 1998. *Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfert kinetics and biotransformation*. *Fisheries science*, 6: 315-383.
- BOUICH et RADJA, 2012. Contrôle de la qualité microbiologique et toxicologique de la moule (*Mytilus galloprovincialis*) (Lamarck, 1819) de Bordj elkiffan bateau cassé, et de la ferme ORCA (Ain Chroub) p.22-42
- BOURDEAU P. ; LASSUS P. ; TURQUET J. et QUOD J-P., 2001. *Rôle écologique et transfert des phycotoxines dans les chaînes alimentaires*. In : *Toxines d'algues dans l'alimentation*. FREMY J-M, LASSUS P., Ed. Ifremer, Plouzané, p. 251-295.
- CHATEAU-DEGAT M.L, mai 2004. *Les toxines marines : problèmes de santé en émergence*, *Vertigo*. La revue en science de l'environnement sur le WEB, Vol 4 N° 1.
- COLLINS C.; GRAHAM J.; BROWN L.; BRESNAN E.; LACAZE JP. et TURRELL EA., 2009. *Identification and toxicity of *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae) in scottish waters*. *Journal of Phycology* 45:692-703.
- DAO, 2006. *Phytoplancton et phyto-toxines : un problème de santé publique* (www.aret.asso.fr) consulté en septembre 2013.

BIBLIOGRAPHIE

- DICKEY RW. et PLAKAS SM. 2009. *Ciguatera: A public health perspective*. *Toxicon* doi:10.1016/j.toxicon.2009.09.008.
- DICKEY R.; JESTER E.; GRANADE R.; MOWDY D.; MONCREIFFC.; REBARCHIK D.; ROBL M.; MUSSER S. et POLI M., 1999. *Monitoring brevetoxins during a Gymnodinium breve red tide: comparison of sodium channel specific cytotoxicity assay and mouse bioassay determination on neurotoxic shellfish toxins in shellfish extracts*. *Nat. Toxins*, Sao Paulo, Brazil, May 21-25.
- DRAISCI R. ; LUCENTINI L. ; GIANNETTI L. ; BORIA P. et POLETTI R., 1996. *First report of pectenotoxin-2 (PTX-2) in algae (Dinophysis fortii) related to seafood poisoning in Europe*. *Toxicon* 34: 923-935.
- ESTRADA A.; ASCENCIO F.; CONTRERAS RG.; CERREJIDO M.; SHOSHANI L.; TORRES R. et LAGOS N., 2007. *Absorption of paralyzing toxins from the dinoflagellate Gymnodinium catenatum in giant lions-paw scallop Nodipecten subnodosus*. *Journal of Shellfish Research* 26:1309-1309.
- France 3 aout 2006 une algue irritante dans les eaux marseillaises, article lien internet: <http://mediterranee.france3.fr/dossiers/23421388-fr.php> consulté le 02 septembre 2013.
- FREMY Jean-Marc et LASSUS Patrick, 2001. *Toxines d'algues dans l'alimentation*. Ed. Paris: Ifremer. 552 p. ISBN 2-84433-052-5
- Fribourg, 2008. In <http://project.eia-fr.ch/electrophorese> consulté le 13 aout 2013.
- FUJIKI H.; SUGANUMA M.; NAKAYASA M.; HAKII H.; HORIUCHI T. et al, 1986. *Palytoxin is a non-12-Otetradecanoylphorbol-13-acetate type tumor promoter in two-stage mouse skin carcinogenesis*. *Carcinogenesis* 7: 707–710.
- GLAZIEOU P. et LEGRAND A.M., 1994. *The epidemiology of ciguatera fish poisoning*. *Toxicon*, 32(8), 863-873.
- GUÉGUEN Marielle, 2009. *Modélisation de la détoxification de mollusques bivalves contenant des phycotoxines paralysantes ou diarrhéiques*. TH. DOC. Université De Nantes UFR Sciences et Techniques. Ed. Europe. p. 10-125.
- GRIMMELT B.; NIJJAR MS.; BROWN J.; WAGNER S.; JOHNSON GR et AHMED JF., 1990. *between domoic acid and levels in the blue mussel (Mytilus edulis) and toxicity in mince*, Medline.
- HALL et al., 1990, *Chemistry, and Pharmacology*. In. *Marine Toxins: Origin, structure, and molecular pharmacology*, American Chemical Society. P. 29-65.

BIBLIOGRAPHIE

- HALLEGRAEFF GM., 1995. *Harmful algal blooms: a global overview*. In: Manual on harmful Marine Microalgae. ed. IOC Manuals and Guides N°33 UNESCO: p 1-22.
- HESS P. et AASEN AB., 2007. *Chemistry, origins, and distribution of yessotoxin and its analogues*. In: Phycotoxins – Chemistry and biochemistry. Botana LM. Ed. Blackwell publishing, Iowa, USA, p. 187-202.
- Ifremer, 2001, 2006. site internet: <http://www.ifremer.fr> consulté en juillet, aout et septembre 2013.
- IGNATIADES L.; GOTSIS-SKRETAS O. et METAXATOS A., 2007. *Field and culture studies on the ecophysiology of the toxic dinoflagellate Alexandrium minutum present in Greek coastal waters*. Harmful Algae. 6:153-165.
- Institut National de veille Sanitaire, mise à jour le 7 novembre 2001, guide pour l'intervention épidémiologique Saxitoxine.
- ISHIDA H. ; NOZAWA A. ; TOTORIBE K. ; MURAMATSU N. ; NUKAYA H. ; TSUJI K. ; YAMAGUSCHI K. ; YASUMOTO T. ; KASPAR H. ; BERKETT N. et KOSUGE T., 1995. *Breviatoxin B1, a new polyether marine toxin from the new Zealand shellfish, Austrovenus stutchburyi*. Tetrahedron Lett., 36, 725-728.
- KAO CY., 1993. *Paralytic shellfish poisoning*. In: Falconer IR. Ed. *Algal Toxins in Seafood and drinking water*. Academic Press, San Diego, p 75-86.
- KRYS S. et FREMY JM., décembre 2002. *Phycotoxines et produits de la mer: risques sanitaire associés et mesures de prévention*, revue française des laboratoires n°348.
- LAWRENCE J.F., CHARBONNEAU C.F., MENARD C., 1991. *Liquid chromatographic determination of domoic acid in mussels, using AOAC paralytic shellfish poison extraction procedure : collaborative study*. J0 AOAC Ant., 74, 68-72.
- LEDREUX Aurélie, 2010. *Contribution à l'évaluation du risque pour l'homme lors de l'apparition de neurotoxines émergentes : analyse de réponses cellulaires et sélection de modèles expérimentaux de criblage*. TH. DOC. Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech). Ed. Paris. p. 157
- LEGEAS M.; BERTAND N.; CATHALA D. et DELHAIE S., 2007. *Atelier Santé Environnement : Les toxines marines sur le littoral français, état des connaissances*. Formation Ingénieur de génie sanitaire. ENSP.Université de RENNES. p
- LEGRAND A.M.; FUKUI M.; CRUCHET P. et YASUMOTO T., 1992. *Chimie des toxins de la ciguatera*. Bull. soc. Patho. Exot., 85, 467-469.

BIBLIOGRAPHIE

- LEHANE L. et LEWIS RJ., 2000. *Ciguatera: recent advances and but the risk remains*. Int. J. Food Microbiol. 61: 91-125.
- LEWIS RJ.; SELLIN M.; POLI MA.; NORTON RS.; MACLEOD JK. et SHEIL MM., 1991. *Purification and characterization of ciguatoxins from moray eel (*Lycodontis javanicus*, Muraenidae)*. Toxicon 29: 1115-1127.
- LIPKIND GM. et FOZARD H., 1994. *A structural model of the tetrodotoxin and saxitoxin binding site of the Na⁺ channel*. Biophys. J. 66: 1-13.
- LLEWELLYN LE. et DOYLE J., 2001. *Microtitre plate assay for paralytic shellfish toxins using saxiphilin: gauging the effects of shellfish extract matrices, salts and pH upon assay performance*. Toxicon 39: 217-224.
- LOMBET A.; BIDARD J-N. et LAZDUNSKI M., 1987. *Ciguatoxin and brevetoxins share a common receptor site on the neuronal voltage dependent Na⁺ channel*. FEBS Lett. 219: 355-359.
- MASSELIN P.; AMZIL Z.; ABADIE E.; NÉZAN E.; LE BEC C.; CHIANTELLA C. et TRUQUET P., 2000. *Paralytic shellfish poisoning on the French Mediterranean coast in the autumn 1988: Alexandrium tamarense complex (Dinophyceae) as causative agent*. In: HALLEGRAEFF GM.; BLACKBURN SI.; BOLCH CJ. et LEWIS RJ. Ed. Harmful Algae Blooms. JOC-UNESCO, p 407-410.
- MCMAHON T. et SILKE J., 1996. *Winter toxicity of unknown aetiology in mussels*. Harmful Algae News 14: 2.
- MILES CO., 2007. *Pectenotoxins*. In: Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry, Botana LM. Ed. Blackwell Publishing, Iowa, USA, pp. 159-186.
- MURATA M.; KUMAGAI M.; LEE JS. et YASUMOTO T., 1987. *Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning*. Tetrahedron Lett. 28, 5869-5872.
- NOMURA F.; IWATA Y.; NAKAYA K. et SUGITANI A., 1983. *An outbreak of foof poisoning due to diarrhetic shellfish poison in Gifu Prefecture*. J. Food Hyg. Soc. Jpn., 24 (6), 573-578
- ONUMA Y.; SATAKE M.; UKENA T.; ROUX J.; CHANTEAU S.; RASOLOFONIRINA N. ; RATSIMALOTO M. ; NAOKI H. et YASUMOTO T., 1999. *Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism*. Toxicon 37: 55-65.

BIBLIOGRAPHIE

- PAZ B.; DARANAS AH.; NORTE M.; RIOBÓ P.; FRANCO JM. et FERNÁNDEZ JJ., 2008. *Yessotoxins, a group of marine polyether toxins: an overview*. Mar. Drugs 6: 73-102.
- PUISEUX-DAO S.; MOLGO J.; BENOIT E.; FESSARD V. et PUECH L., 2001. *Toxicologie*. In: FRÉMY JM. et LASSUS P. ed. *Toxines d'algues dans l'alimentation*. Ifremer-Afssa, P 299-368.
- QUILLIAM M.A.; XIE M. et HARDSTAFF W.R., 1995. *Rapid extraction and cleanup for liquid chromatographic determination of domoic acid in unsalted seafood*. J. AOAC Int., 78, 543-554.
- REPHY, 2007-2010. <http://www.ifremer.fr/envlit/surveillance/rephy.htm>. Consulté en juillet, août et septembre 2013.
- REIZOPOULOU S. ; STROGYLOUDI E. ; GIANNAKOUREOU A. PAGOU K. HATZIANESTIS I. PYRGAKI C. et GRANELI E. *Okadaic acid accumulation in macrofilter feeders subjected to natural blooms of dinophysis acuminata*. Harmful. Algae 7: 228 – 234p.
- SAYFRITZ SJ.; AASEN JAB. et AUNE T ., 2008. *Determination of paralytic shellfish poisoning toxins in Norwegian shellfish by liquid chromatography with fluorescence and tandem mass spectrometry detection*. Toxicon 52:330-340
- SECHET V.; BERARD JB.; BOHEC M.; BOUGARAN G.; CARRÉ C.; MASSELIN P. et TRUQUET P., 2003. *Growth and toxicity of Alexandrium catenella isolated from thau lagiin (France) cultured in stirred tank bioreactors*. In: Villarba A, Reguera B, Romalde JL, Bairas R. ed. *Molluscan Shellfish Safety*, p 135-144.
- SCHEINER-BOBOS G., 2002. *The sodium pump- its molecular properties and mechanics of ion transport*. Eur. J. Biochem. 269: 2424-2433.
- SMITH JC., 1993. *Toxicity and Pseudo-nitzschia pungens in Prince Edward Island*. Harmful Algae 6, 1987-1992.
- STOBO LA.; LACAZE J.; SCOTT AC.; PETRIE J. et TURRELL EA., 2008) *Surveillance of algal toxins in shellfish from Scottish waters*. Toxicon 51:635-648
- SU Z.; SHEETS M.; ISHIDA H.; LI F. et BARRY WH., 2004. *Saxitoxin blocks L-Type Ica*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 308: 324–329.
- TAKEMOTO T. et DAIGO K., 1958. *Constituents of Cbondria armata*. Chem. Pharm. Bull., 6,578-580.

BIBLIOGRAPHIE

- TANIYAMA S.; ARAKAWA O.; TERADA M.; NISHIO S.; TAKATANI T.; MAHMUD Y. et NOGUCHI T., 2003. *Ostreopsis* sp., a possible origin of palytoxin (PTX) in parrotfish *Scarus ovifrons*. *Toxicon* 42: 29-33.
- TILLMANN U.; ELBRACHTER M.; KROCK B.; UWE J. et CEMBELLA A., 2009. *Azadinium spinosum* gen. et sp. nov. (Dinophyceae) identified as a primary producer of azaspiracid toxins. *European Journal of Phycology* 44: 63-79.
- TOUZET N.; FRANCO JM. et RAINE R., 2008. *Morphogenetic diversity and biotoxin composition of Alexandrium (Dinophyceae) in Irish coastal waters*. *Harmful Algae* 7:782-797
- TWINER MJ.; REHMANN N.; HESS P. et DOUCETTE GJ., 2008a. *Azaspiracid shellfish poisoning: a review on the chemistry, ecology, and toxicology with an emphasis on human health impacts*. *Marine Drugs* 6: 39-72.
- Vale P., 2008. *Complex profiles of hydrophobic paralytic shellfish poisoning compounds in Gymnodinium catenatum identified by liquid chromatography with fluorescence detection and mass spectrometry*. *Journal of Chromatography. A* 1195:85-93.
- WANG S-Y. et WANG GK., 2003. *Voltage-gated sodium channels as primary targets of diverse lipidsoluble neurotoxins*. *Toxicon* 15: 151-159.
- WRIGHT JLC. ; BOYD RK. ; DEFREITAS ASW. ; FALK M.; FOXALL RA.; JAMIESON WD. ; LAYCOCK MV. ; MCCULLOCH AW. ; MCINNES AG.; ODENSE P.; PATHAK VP.; QUILLIAM MA.; RAGAN MA.; SIM PG.; THIBAUT P.; WALTER JA.; GILGAN M.; RICHARD DJA. et DEWAR D., 1989. *Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino-acid in toxic mussels from eastern Prince Edward island*. *Canadian Journal of Chemistry* 67: 481-490.
- YASUMOTO T.; NAKAJIMA I.; OSHIMA Y. et BAGNIS R., 1979. *A new toxic dinoflagellate found*. in: D.L. Taylor and H. Selinger, Editors, *Toxic Dinoflagellate Bloom*, Elsevier: 65-70.
- YASUMOTO T.; YASUMURA D.; OHIZUMI Y.; TAKAHASHI M.; ALCALA AC. et ALCALA LC., 1984. *Palytoxin in two species of xanthid crab from the Philippines*. *Agric. Biol. Chem.* 50: 163-167.

Sommaire

Introduction

Chapitre I :

Rappel

bibliographique

Chapitre II : Techniques d'analyse

Chapitre III :

Résultats

Conclusion

Références
Bibliographiques

Annexes