



anses

Les brévéttoxines

Exposition par consommation de coquillages, par inhalation d'embruns ou par contact en cas de baignade ou d'activités nautiques

Avis révisé et avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective

Décembre 2021



CONNAÎTRE, ÉVALUER, PROTÉGER

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 22 décembre 2021

AVIS* **de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail**

**sur l'état des connaissances relatives aux brevétotoxines dans les coquillages,
données de toxicité, d'occurrence et microalgues productrices**

*L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.
L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.
Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part à l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.
Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).
Ses avis sont publiés sur son site internet.*

L'Anses a été saisie le 14 janvier 2020 par la direction générale de l'alimentation (DGAL) et la direction générale de la santé (DGS) pour la réalisation d'une expertise quant à la toxicité aiguë et chronique des brevétotoxines susceptibles d'exposer le consommateur à un risque par ingestion, par inhalation ou par contact.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

En France, de nombreuses toxines non réglementées sont suivies dans le cadre du réseau de veille d'émergence des biotoxines marines dans les coquillages (EMERGTOX) dont le comité de pilotage est présidé par la DGAL et inclut la DGS, la Direction des pêches maritimes et de l'aquaculture (DPMA), Santé publique France, l'Anses, l'Ifremer et la Direction de l'eau et de la biodiversité (DEB).

Les brevétotoxines sont incluses dans ce réseau depuis janvier 2018.

Elles ont été mises en évidence pour la première fois en France en novembre 2018 dans des moules en Corse (117 µg/kg de glande digestive). Le prélèvement d'eau associé pour le suivi du phytoplancton a montré la présence de *Karenia* spp. (genre de microalgues dont certaines espèces produisent des brevétotoxines).

* Annule et remplace l'avis du 02 mars 2021

Il n'existe pas de limite maximale pour ces toxines dans le règlement (CE) n°853/2004. Les USA, l'Australie/Nouvelle-Zélande et le Mexique appliquent un seuil à 800 µg d'équivalent BTX-2/kg de chair de coquillages. Dans la norme CODEXSTAN 292–2008 (rev.2015) du *Codex alimentarius*, la limite maximale pour les brévétotoxines est de 200 unités souris¹ ou équivalent par kg de chair de mollusque vivant.

Dans ce contexte, il a été demandé à l'Anses de fournir des éléments de réponse aux questions suivantes :

Question 1. Quelles sont les données toxicologiques disponibles pour les brévétotoxines ? Permettent-elles à l'Anses de proposer des valeurs toxicologiques de référence aiguë et chronique par voie orale ?

Question 2. Sur la base des données toxicologiques identifiées par l'Anses, est-il possible de proposer une valeur guide dans les coquillages au-delà de laquelle des investigations complémentaires seraient demandées dans le cadre du réseau EMERGTOX ?

Question 3. Quelles modalités de suivi des brévétotoxines dans le milieu marin pourraient être recommandées dans le cadre du réseau EMERGTOX ? Quelles investigations complémentaires seraient à réaliser en cas de dépassement de la valeur guide ?

Question 4. Compte tenu des données toxicologiques et au vu du contexte, existe-t-il une préoccupation de santé publique aux niveaux de contamination identifiés dans certaines zones marines françaises liée à la consommation de coquillages ?

Question 5. Existe-t-il une préoccupation sanitaire liée à l'exposition aux brévétotoxines par un contact direct avec de l'eau contaminée notamment en cas de baignade ou de pratique d'activités nautiques ou en cas d'exposition par inhalation à des embruns ?

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

Dans le contrat d'expertise du 31 mars 2020, l'Anses a indiqué à la DGAL et à la DGS que les questions 1 à 4 relèvent du domaine de compétences du Comité d'experts spécialisé « Evaluation des risques physico-chimiques dans les aliments » (CES ERCA). La question 5 relève du domaine de compétences du CES « Évaluation des risques liés à l'eau » (CES EAUX) et sera traitée dans un second temps. L'avenant du 27 janvier 2021 indique que les travaux d'expertise seront validés par le CES EAUX au cours du premier semestre 2021. Un rapport final comprenant les réponses à l'ensemble des questions sera transmis au plus tard en décembre 2021.

L'Anses a confié l'instruction des quatre premières questions au groupe de travail « Brévétotoxines », constitué par décision du 14 mai 2020 suite à un appel public à candidatures.

Les travaux d'expertise du groupe de travail « Brévétotoxines » ont été soumis régulièrement au CES ERCA (tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques) lors des réunions plénières du 5 mars 2020, 7 octobre 2020, 4 novembre 2020, 6 janvier 2021 et 10 février 2021.

¹ Le bio-essai sur souris est une méthode analytique utilisée pour la détection des biotoxines marines dans les coquillages. Une unité souris (US) correspond à la quantité d'extrait brut causant la mort de 50% des souris.

Le rapport produit par le groupe de travail tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES et les relecteurs. Les travaux d'expertise ont été adoptés par le CES ERCA le 10 février 2021 à l'unanimité des experts présents.

Ces travaux sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires.

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet : <https://dpi.sante.gouv.fr/>.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GT « BREVETOXINES » ET DU CES ERCA

Le Comité d'experts spécialisé « Evaluation des risques physico-chimiques dans les aliments » (CES ERCA) a adopté le rapport d'expertise collective réalisé par le groupe de travail « Brévétotoxines » dont une synthèse est présentée ci-après.

Les travaux d'expertise se sont basés sur une revue systématique (de type « scoping review »). Deux bases de données (Scopus et Pubmed) ont été interrogées le 14 mai 2020 ce qui a permis d'identifier 868 références qui ont ensuite été sélectionnées suivant plusieurs critères (détaillés dans le rapport, section 1.5.1). Une mise à jour de la recherche bibliographique a été réalisée en octobre 2020, identifiant quatre publications supplémentaires, ainsi qu'un article mis en ligne en décembre 2020, qui ont été ajoutés au corpus de références.

3.1. Voies d'exposition pour l'Homme

L'Homme peut être exposé aux brévétotoxines par voie alimentaire, par inhalation et par contact cutanéomuqueux.

3.2. Caractérisation chimique

Les brévétotoxines correspondent à une famille de biotoxines marines lipophiles comprenant une trentaine de métabolites dont la structure chimique est connue. A cela s'ajoute une trentaine d'autres métabolites dont la formule brute et la structure développée n'ont pas été caractérisées chimiquement ; ces métabolites sont généralement issus de la métabolisation par les coquillages.

3.2.1. Liste des brévétotoxines pour l'expertise

Sur la base des données de toxicité, d'occurrence dans les coquillages et de la disponibilité des étalons, la liste des brévétotoxines (BTX) que le GT propose de considérer comme prioritaires est constituée de : BTX-1, BTX-2, BTX-3, BTX-B1, BTX-B2, S-désoxy-BTX-B2, BTX-B3, BTX-B4(a et b).

3.2.2. Méthodes analytiques

Trois grands types de méthodes peuvent être mis en œuvre pour l'analyse des brévétotoxines dans des cellules microalgales, des prélèvements d'eaux lors d'efflorescences, des organismes marins (mollusques, poissons) et des prélèvements d'embruns/d'aérosols :

1. les méthodes physico-chimiques (telles que les méthodes par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse, LC-MS) permettent soit de manière ciblée d'identifier et quantifier les brevétotoxines pour lesquelles des étalons sont disponibles, soit de manière non ciblée en haute résolution de détecter d'éventuels nouveaux analogues de brevétotoxines ;
2. les méthodes biochimiques, telles que des tests de liaison spécifique (RBA) ou des tests immunologiques (RIA, ELISA), permettent une quantification globale des brevétotoxines ;
3. les méthodes biologiques (*in vivo* et *in vitro*), notamment le bio-essai sur souris, le bio-essai sur poisson, le bio-essai cellulaire sur neuroblastomes (Neuro-2a), permettent de déterminer l'activité biologique globale des brevétotoxines.

Plusieurs de ces méthodes ont été validées en intra- et inter-laboratoires. Toutefois, aucune n'a fait l'objet d'une validation inter-laboratoires suivant les lignes directrices de référentiels tels que l'ISO 5725 ou l'annexe D de l'AOAC. Ainsi, à ce jour, aucune méthode permettant la recherche des brevétotoxines n'est normalisée.

3.3. Microalgues productrices de brevétotoxines

Les brevétotoxines sont produites par des microalgues marines, principalement *Karenia brevis*. *K. brevis* n'a pas été recensée sur le littoral français métropolitain à ce jour. D'autres microalgues sont suspectées de produire des brevétotoxines. C'est le cas de *K. mikimotoi*, *K. bicuneiformis*, *Chattonella marina*, *C. antiqua*, *Heterosigma akashiwo* et *Fibrocapsa japonica*. Ces espèces sont présentes sur les côtes françaises, mais leur capacité de production de brevétotoxines n'a pas été confirmée, sauf pour *K. papilionacea*, dont la production de BTX-2 a été confirmée en conditions de laboratoire.

Par ailleurs, ces microalgues produisent également d'autres toxines et métabolites secondaires qui pourraient constituer un danger pour l'Homme mais qui ne font pas l'objet de cette saisine.

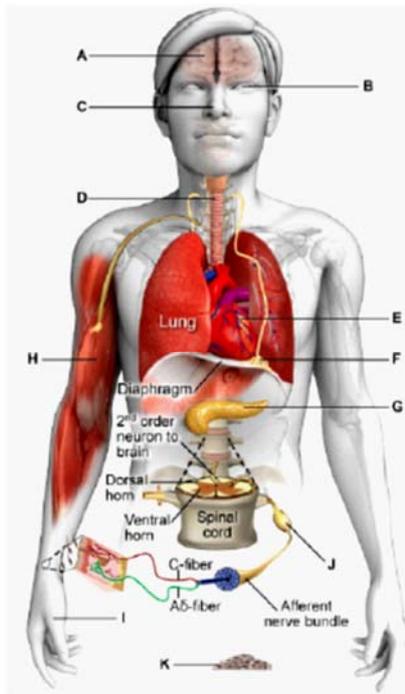
3.4. Effets des brevétotoxines sur les organismes

3.4.1. Cibles moléculaires et mode d'action

Les brevétotoxines sont des neurotoxines dont la cible principale est le canal Na^+ sensible au potentiel de membrane (Na_v). Les canaux Na_v forment une famille de protéines transmembranaires qui assurent les flux passifs d'ions Na^+ à la surface des membranes de cellules excitables majoritairement, mais également de cellules non excitables. Les canaux Na_v existent sous trois états : fermés, ouverts ou inactivés. La fixation des brevétotoxines au site 5 des canaux Na_v induit leur activation en ralentissant la phase d'inactivation et en favorisant leur activation à des potentiels membranaires plus négatifs que le seuil normal d'activation de ces canaux. Les brevétotoxines peuvent donc être considérées comme des activateurs des canaux Na_v , à l'instar des ciguatoxines. Ce faisant, elles dépolarisent les membranes des cellules neuronales et musculaires et favorisent leur excitabilité ainsi que des mécanismes intracellulaires dépendants du Ca^{2+} .

Cette interaction entre les brevétotoxines et les canaux Na_v et la distribution tissulaire des canaux Na_v (Figure 1) expliquent la nature essentiellement neurologique des symptômes observés chez l'Homme et l'animal, au niveau des systèmes nerveux, central et périphérique, mais également gastro-intestinaux et cardiovasculaires.

Le brevénal, produit par *K. brevis*, possède une activité antagoniste des brevéttoxines, en se liant aux canaux Na_v et en perturbant la liaison des brevéttoxines.



	Tissu	Sous-type de canal Nav exprimé
A	Système nerveux central	1.1, 1.2, 1.3, 1.6
B	Rétine	1.8, 1.9
C	Neurones olfactifs	1.7
D	Neurones sensoriels et neurones innervant les voies respiratoires	1.7, 1.8, 1.9
E	Cœur	1.5, 1.8
F	Nerfs, muscles respiratoires	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.6, 1.7
G	Cellules β pancréatiques	1.7
H	Muscles squelettiques	1.4
I	Peau	1.7, 1.8
J	Neurones sensoriels de la racine dorsale	1.1, 1.3, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9
K	Cellules cancéreuses métastatiques	1.1, 1.9

Figure 1 : Expression tissulaire des canaux Nav (d'après de Lera Ruiz et Kraus, 2015 ; il s'agit d'une traduction non officielle d'un article paru dans une publication de l'ACS)

3.4.2. Toxicocinétique et toxicité *in vivo*

Polyéthers liposolubles, les brevéttoxines possèdent la capacité de franchir la plupart des barrières biologiques (gastro-intestinale, hémato-encéphalique, placentaire). Les études sur rongeurs montrent qu'après ingestion, elles sont rapidement absorbées (quelques minutes) et distribuées dans la plupart des organes (foie, intestins, muscles squelettiques) et peuvent y persister plusieurs jours. Elles sont métabolisées dans le foie et l'excrétion est majoritairement hépatobiliaire, minoritairement urinaire.

Très peu de données toxicocinétiques sont disponibles chez l'Homme. Les seules informations sont issues de dosage urinaire des brevéttoxines dans les heures qui ont suivi l'ingestion de coquillages contaminés par les brevéttoxines. Cette mesure peut être utilisée pour confirmer un cas d'intoxication, à condition d'être réalisée rapidement après ingestion.

Chez l'animal de laboratoire suite à une exposition aiguë aux brevéttoxines les effets observés sont variés, consécutifs à une atteinte du système nerveux central et périphérique. Les effets neurovégétatifs comprennent notamment hypersialorrhée (hypersalivation), larmoiement, miction et défécation, parfois rhinorrhée et mouvements de mastication compulsive. Les symptômes périphériques somatiques incluent des tremblements, des fasciculations musculaires, ainsi qu'un raidissement de la queue. Au niveau cardio-respiratoire, on peut citer une dyspnée, une gêne respiratoire, des troubles cardiaques (contractilité et rythme) et hémodynamiques. Enfin, les signes centraux incluent l'ataxie, des crises convulsives et une réduction de la température corporelle.

Chez des moutons exposés par instillations intranasales, des difficultés respiratoires (bronchoconstriction) ont été observées, et l'administration simultanée de brevénal, un métabolite de *K. brevis*, a réduit les signes respiratoires produits par les brevéttoxines.

La survenue d'effets retardés ou de séquelles à la suite d'une exposition aiguë a été discutée par le GT, ainsi que la possibilité d'effets à long terme d'une exposition répétée à des doses faibles (toxicité chronique). Cependant, le GT n'a identifié aucune étude dans la littérature abordant ces aspects. Ceux-ci devraient être considérés compte tenu de la similitude entre les brevéttoxines et les ciguatoxines, des neurotoxines responsables de la ciguatera dont les effets perdurent pendant des mois voire des années après une exposition aiguë.

Les effets des brevéttoxines sur la reproduction et le développement chez les mammifères ne sont pas connus.

3.4.3. Toxicité chez l'Homme

Les symptômes associés à une exposition aux brevéttoxines ainsi que leur durée dépendent de la voie d'exposition (alimentaire, inhalation, contact cutanéomuqueux). Ci-après sont brièvement résumées les connaissances relatives à l'exposition par ingestion.

Le syndrome nommé « Neurotoxic Shellfish Poisoning » (NSP, intoxication neurologique par fruits de mer) désigne l'intoxication liée à l'ingestion de coquillages contaminés par des brevéttoxines. Les symptômes débutent généralement entre 1 h et 24 h après l'exposition, et peuvent persister jusqu'à 3 jours. Le syndrome NSP se caractérise principalement par l'apparition de symptômes digestifs et neurologiques. Les signes digestifs incluent des douleurs abdominales, nausées, vomissements et diarrhées. Les signes neurologiques comprennent essentiellement des paresthésies (lèvres et extrémité des membres), des vertiges, une asthénie, ainsi qu'une paralysie partielle des membres, des troubles de l'élocution, une perte de coordination et un coma dans les cas les plus graves. Une inversion de la sensation de température, une mydriase ainsi que des troubles cardio-vasculaires (bradycardie, hypotension artérielle) ont également été rapportés. Il n'existe pas d'antidote des brevéttoxines, le traitement est symptomatique. Aucun décès n'a été rapporté à ce jour.

Quelques centaines de cas d'intoxications humaines liées à la consommation de coquillages contaminés par les brevéttoxines ont été décrits dans des revues internationales. Le faible nombre de ces événements peut être expliqué par la mise en place d'une réglementation relative à la commercialisation des coquillages via une surveillance de la présence des cellules de *K. brevis* le long des côtes américaines du Golfe du Mexique, ainsi qu'en Australie/Nouvelle Zélande. Le nombre de cas d'intoxications humaines reste malgré tout sous-estimé, y compris en Floride où cette intoxication est pourtant à déclaration obligatoire.

Les symptômes les plus fréquemment observés sont des paresthésies des extrémités des membres et péri-orales, observées dans les cas les plus bénins : picotements ressentis après la consommation de seulement 2-3 huîtres (McFarren et al. 1965). Dans des cas sévères (observés chez de jeunes enfants), ont été décrits une perte de connaissance, des convulsions, de la tachycardie, de la tachypnée.

Plus de dix symptômes, principalement gastro-intestinaux, neurologiques et cardiovasculaires, peuvent être associés à une intoxication alimentaire par les brevéttoxines.

3.4.4. Génotoxicité

Les études portant sur la mutagenèse et la génotoxicité de certaines brevétotoxines ont mis en évidence des effets significatifs sur différents paramètres. Cependant, les conditions expérimentales de ces essais comportent de nombreuses et importantes limites méthodologiques et/ou sont entachées de déviations majeures ce qui ne permet pas de valider les résultats ou d'endosser leur interprétation. Il n'est donc pas possible de conclure quant au potentiel mutagène et génotoxique des brevétotoxines. Les effets observés vis-à-vis de ces paramètres biologiques représentent tout au plus des « alertes ».

Afin d'obtenir des résultats fiables et consolidés, la stratégie doit être mise en œuvre selon une approche par étapes telle que recommandée par l'Efsa (2011) pour la production et l'évaluation des données sur le potentiel génotoxique et mutagène d'une substance (cf paragraphe 3.8 sur les besoins de recherche).

3.4.5. Ecotoxicité

En plus des effets sur la santé humaine, les proliférations de *K. brevis* et d'autres espèces du genre *Karenia* ont causé des mortalités massives de poissons, d'oiseaux marins, de tortues et de mammifères marins. Les effets des brevétotoxines sur des organismes marins ou littoraux ont été décrits après exposition expérimentale ou environnementale. Les brevétotoxines induisent des épisodes de fortes mortalités lors d'efflorescences importantes correspondant à plusieurs millions de cellules par litre.

Plusieurs voies d'exposition ont été identifiées : (1) par exposition directe via l'ingestion de cellules microalgales et/ou la filtration d'eau contenant des brevétotoxines libérées après lyse des cellules; (2) par ingestion via la chaîne alimentaire et/ou (3) par inhalation, lorsque les brevétotoxines sont aérosolisées lors d'efflorescences de *Karenia*.

La survie des invertébrés marins est peu affectée, mais des effets sublétaux (altérations du développement, de la croissance et du comportement alimentaire et de nage) ont été observés. Chez les poissons, l'exposition à des concentrations sublétales de brevétotoxines et/ou de cellules de *K. brevis* induit des signes affectant notamment les branchies et les fonctions respiratoires, ainsi que le système nerveux central et le comportement natatoire. Chez les mammifères marins (lamantins, dauphins), terrestres des zones littorales (coyotes, chiens) et les tortues marines, des signes neurologiques (notamment désorientation, ataxie, convulsions) ont été observés parallèlement à la quantification de brevétotoxines dans les tissus et fluides biologiques lors/à la suite d'efflorescences de *K. brevis*.

3.5. Caractérisation du danger

Les données de toxicité aiguë chez l'animal sont très limitées et ne permettent pas d'identifier une dose sans effet néfaste ni une dose minimale avec effets néfastes. La seule étude réalisée par voie orale avait pour objectif de déterminer les doses létales à 50 % (DL₅₀) de la BTX-2 et de la BTX-3. Cette mesure ne peut pas être retenue comme point de départ d'une valeur toxicologique de référence, car cela ne serait pas suffisamment protecteur.

Chez l'Homme, les données sont également trop limitées pour pouvoir établir une valeur toxicologique de référence aiguë (ARfD).

Néanmoins, à partir des données de cas d'intoxications humaines liées à la consommation de coquillages contaminés par des brevétotoxines, le GT a identifié des doses (quantités de

brévétotoxines ingérées) minimales associées à des symptômes (« LOAEL aiguë ») et des concentrations minimales dans les coquillages associées à des symptômes (Tableau 1).

Tableau 1 : Doses minimales de brevétotoxines associées à des symptômes (« LOAEL aigües ») et concentrations minimales dans les coquillages associées à des symptômes

Etudes	Doses minimales avec des symptômes (« LOAEL aiguë »)	Concentrations minimales dans la chair des coquillages associées à des symptômes
Mc Farren et al. (1965)	405-540 US/personne pour des symptômes moyens. Une dose de 54-81 US/personne a induit des symptômes mineurs (paresthésies seules) chez 1 cas. Des symptômes ont été associés à une dose de 91 US/personne (les auteurs ont pris un poids de chair de 20 g par huître). <i>Complément par le GT :</i> En retenant un poids de chair consommé de 10 g* au lieu de 20 g, le GT estime que la dose minimale avec des symptômes serait de 27-40,5 US/personne (2-3 huîtres à 10 g de chair, contaminées à 135 US/100 g de chair)	135 US/100 g pour des symptômes moyens. > 65 US/100 g
Hemmert, 1975	0,3-0,4 US/kg p.c.	75-118 US/100 g
Morris, 1991		35 et 60 US/100 g
Watkins, 2008 ; Terzagian, 2006		24 et 42,9 mg/kg
Pour comparaison, la teneur maximale retenue par le Codex Alimentarius et l'US-FDA, Australie/Nouvelle-Zélande, Mexique		20 US/100 g 800 µg BTX-2/kg

US : unité souris ; * Le GT a considéré une masse de chair de 10 g/huître en prenant en compte un indice de chair de 10 % (celui-ci variant de 6,5-10,5 %) et l'hypothèse d'huîtres de 100 g (calibre n°2, 86-110 g) coquille comprise.

Une unité souris (US) correspond à la quantité d'extrait brut qui tue 50% des souris (20 g) en 930 minutes (15,5 h). 1 US = 3,4 µg BTX-3 ou 4 µg BTX-2, selon Baden et Mende (1982).

Sur la base des données rapportées par Morris (1991), Gessner (2000) propose une estimation de la dose entraînant des symptômes mineurs se situant entre 42 et 72 US/personne. Cette valeur est souvent reprise dans les travaux de revue mais elle est jugée très incertaine par le GT. Elle prend pour hypothèse une consommation de 12 huîtres (120 g en considérant un poids de chair de 10 g par huître) comme seuil entraînant des symptômes chez une faible proportion de personnes (2 cas/15 dans le groupe des faibles consommateurs) parmi 84 consommateurs au total. Cependant, elle se base sur les niveaux de contamination d'huîtres mesurés dans les restes de 2 repas (35 et 60 US/100 g) qui n'ont causé que quatre des 48 cas quantifiés. L'article de Morris (1991) n'indique pas combien d'huîtres contaminées à 35 et 60 US/100 g ont été effectivement consommées par ces quatre cas.

Les études de Mc Farren et al. (1965) et Hemmert (1975) ne figurent pas dans l'avis de l'EFSA (2010).

Le GT a jugé ces deux études particulièrement intéressantes pour la suite de l'expertise car elles comportent des informations détaillées sur la symptomatologie, les portions consommées, le poids des individus (pour l'une d'elle) et la quantification de brevétotoxines dans les restes de repas.

Le GT a identifié deux « LOAEL aiguës » pour la suite de ses travaux : celle de 27-40,5 US/personne sur la base de Mc Farren et al. (1965) et celle de 0,3-0,4 US/kg p.c. rapportée par Hemmert (1975).

Le GT a retenu la BTX-3 comme brevétotoxines de référence dans les coquillages (et non la BTX-2). La BTX-3 est la BTX de référence pour le test ELISA, elle présente une DL50 plus faible que celle de la BTX-2. De plus, la BTX-2 est minoritaire dans les coquillages, en comparaison de la BTX-3. La limite de 800 µg BTX-2/kg correspond à 680 BTX-3/kg de chair de coquillages.

En équivalent BTX-3 (1 US = 3,4 µg BTX-3), les « LOAEL aiguës » seraient de 92-138 µg eq. BTX-3/personne sur la base de Mc Farren et al. (1965) et 1,02-1,36 µg eq. BTX-3/kg p.c sur la base de Hemmert (1975).

3.6. Recommandations de valeur guide dans les coquillages

Afin d'évaluer le niveau de protection apporté par la teneur maximale de 20 US/100 g (800 µg BTX-2/kg de chair de coquillages), le GT a comparé l'exposition liée à la consommation de coquillages contaminés à ce niveau avec les 2 « LOAEL aiguës » retenues, sur la base de plusieurs hypothèses de consommation (Tableau 2).

Tableau 2 : Evaluation du caractère protecteur de la teneur maximale de 20 US/100 g (800 µg BTX-2/kg de chair de coquillages ou 680 µg BTX-3/kg de chair de coquillages)

Hypothèses de consommation	Exposition correspondante à la consommation de coquillages contaminés à hauteur de la TM = 20 US/100 g de chair de coquillages	Dose minimale avec des symptômes (« LOAEL aiguë »)	
400 g de coquillages	80 US/personne	0,3-0,4 US/kg p.c. (Hemmert, 1975), hypothèse d'un poids corporel de 70 kg = 21-28 US/personne	27-40,5 US/personne (calculé par le GT sur la base de Mc Farren et al. 1965)
Etude Consomer (huîtres) P 95 = 182,4 g P 97,5 = 255 g	36,5 US/personne 51 US/personne		
Etude Consomer (moules) P 95 = 200 g P 97,5 = 300 g	40 US/personne 60 US/personne		
Etude Consomer (palourdes) P 95 = 50 g P 97,5 = 60 g	10 US/personne 12 US/personne	Soit 1,02-1,36 µg eq BTX-3/kg p.c	Soit 92-138 µg eq. BTX3/personne

Les estimations reposent sur des hypothèses de calcul prises à la fois par les auteurs et par le GT, chacune assortie d'une marge d'erreur difficile à estimer. Il convient donc de considérer les valeurs du Tableau 2 avec un niveau d'incertitude moyen pour l'étude de Hemmert (1975) et fort pour l'étude de McFarren et al. (1965).

Sur la base de la LOAEL aiguë de 0,3-0,4 US/kg p.c. rapportée par Hemmert (1975), avec l'hypothèse d'un poids corporel de 70 kg et d'une consommation par défaut protectrice de 400 g de chair de coquillages, le GT a calculé une teneur de 52,5-70 US/kg de chair de coquillages. Selon Baden et Menden (1982), 1 US = 3,4 µg BTX-3, ce qui correspondrait à une

concentration de **179-238 µg eq. BTX-3/kg de chair de coquillages** (donc 3 à 4 fois plus faible que la limite de 800 µg BTX-2/kg correspondant à 680 BTX-3/kg de chair de coquillages).

Sur la base de la LOAEL aiguë de **27-40,5 US/personne** calculée par le GT à partir de l'étude de Mc Farren et al. (1965), avec l'hypothèse d'une consommation par défaut protectrice de 400 g de chair de coquillages, le GT a calculé une teneur de 67,5-101,25 US/kg de chair de coquillages, soit une concentration de **230-344 µg eq. BTX-3/kg de chair de coquillages** (donc 2 à 3 fois plus faible que la limite de 800 µg BTX-2/kg correspondant à 680 BTX-3/kg de chair de coquillages).

En conclusion, la teneur maximale de 20 US/100 g de chair de coquillage (équivalente à 800 BTX-2/kg de chair de coquillages) n'apparaît pas suffisamment protectrice. **Le GT recommande donc une valeur guide de 180 µg eq. BTX-3/kg de chair de coquillages (correspondant à la somme de l'ensemble des métabolites de BTX recherchés).** L'application d'un facteur de sécurité supplémentaire n'a pas été jugé nécessaire en raison des hypothèses protectrices prises pour les calculs (consommation par défaut de 400 g de chair de coquillages et un poids corporel de 70 kg).

3.7. Surveillance

Aux Etats-Unis, des systèmes de surveillance ont été mis en place, principalement en Floride, au Texas, au Delaware et en Alabama. La surveillance et la maîtrise du danger associé aux efflorescences du genre *Karenia* sont assurées par un suivi régulier de la présence des *K. brevis* dans l'eau. La surveillance des brevéttoxines est réalisée dans les coquillages et dans l'air ou en réponse à un épisode de mortalité massive de poissons ou encore suite à la déclaration de symptômes respiratoires chez l'Homme. Des réseaux de sciences participatives contribuent également à cette surveillance.

Pour les Etats Unis, le Mexique, l'Australie et la Nouvelle Zélande, les autorités sanitaires ont mis en place des seuils : a) en nombre de cellules de microalgues dans l'eau pouvant aboutir à des mesures de gestion préventives ; b) en brevéttoxines dans la chair de coquillages imposant la fermeture des zones de production.

En France, le REPHY² est chargé d'observer l'ensemble des espèces phytoplanctoniques des eaux côtières, par des prélèvements réguliers sur 177 lieux répartis sur tout le littoral métropolitain. Concernant la surveillance des brevéttoxines, elles font partie des toxines suivies par le réseau de veille d'émergence EMERGTOX.

Les brevéttoxines (BTX-2 et/ou BTX-3) ont été détectées pour la 1ère fois en France en novembre 2018, avec un maximum observé en novembre 2020 de 57,4 µg/kg de chair totale de moules pour la somme de BTX-2 et BTX-3. Ces détections ont concerné uniquement des moules de l'étang de Diana en Corse. La présence de brevéttoxines dans les coquillages pourrait s'expliquer par la présence de *Karenia sp.* et/ou d'autres organismes producteurs potentiels de ces toxines, qui a été mise en évidence dans les prélèvements d'eau effectués en parallèle des prélèvements de coquillages. Il est donc primordial d'identifier l'espèce ou les espèces de microalgues productrices de ces toxines dans l'étang de Diana en Corse.

² Réseau d'Observation et de Surveillance du Phytoplancton et de l'Hydrologie dans les eaux littorales (REPHY) mis en œuvre par l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (Ifremer)

3.8. Besoins de recherche

Le GT a identifié un manque de connaissances et a recommandé les pistes de recherche suivantes.

Concernant les données de toxicité

- ▶ L'effet des brevétotoxines doit faire l'objet d'une étude de toxicité orale aiguë selon la ligne directrice 424 de l'OCDE pour l'étude de la neurotoxicité (administration unique, période d'observation de 14 jours), chez le rongeur, permettant la description de l'ensemble des symptômes cliniques visibles (en particulier les altérations du comportement telles que l'hyper-réactivité), l'évaluation la plus complète de paramètres biologiques (paramètres respiratoires et cardiovasculaires, suivi de la température interne, effets gastro-intestinaux) pour déterminer la relation dose-effet. Une telle étude permettra de définir un effet critique d'intoxication aiguë et d'identifier une dose sans effet comme point de départ pour dériver une valeur toxicologique de référence. Cette recommandation s'applique prioritairement à la BTX-3, et dans un second temps aux autres brevétotoxines majoritaires dans les coquillages.
- ▶ Afin d'obtenir des résultats fiables et consolidés concernant le potentiel mutagène et génotoxique des brevétotoxines, la stratégie selon une approche par étapes telle que recommandée par l'Efsa (2011) doit être mise en œuvre, en commençant par la batterie de base de tests *in vitro* suivante : 1) un test d'Ames³ (essai de mutation reverse bactérienne) selon la ligne directrice 471 de l'OCDE, 2) une étude d'aberrations chromosomiques, préférentiellement le test *in vitro* du micronoyau selon la ligne directrice 487 de l'OCDE. La brevétotoxine considérée comme la plus pertinente en tant que brevétotoxine de référence devant faire l'objet de cette évaluation est la BTX-3. Le potentiel des autres métabolites majoritaires présents dans les coquillages devrait également être investigué.
- ▶ Il conviendrait d'acquérir des données toxico-cinétiques de la BTX-3 après exposition orale chez le rongeur selon la ligne directrice de l'OCDE 417.
- ▶ Des études de toxicité subaiguë/subchronique doivent être envisagées. Elles seront réalisées par administration orale répétée, de 28 ou 90 jours sur rongeur selon les lignes directrices de l'OCDE 424, 407 ou 408. Cette recommandation s'applique prioritairement à la BTX-3, et dans un second temps aux autres BTX majoritaires dans les coquillages. La toxicité chronique des brevétotoxines doit également être considérée dans des études sur rongeurs.
- ▶ Le caractère toxique des brevétotoxines pour le développement et le neuro-développement doit faire l'objet d'une étude visant à identifier les conséquences d'une exposition de femelles gestantes aux brevétotoxines par voie orale sur sa descendance (lignes directrices de l'OCDE 414 et 426).
- ▶ Les métabolites présents dans les coquillages pour lesquels il n'y a pas de données sur le potentiel toxique devraient être isolés et identifiés (élucider leur structure chimique). Ils

³ Une attention particulière devra être portée en cas d'un test négatif avec une dose maximale analysable < 250 µg/boîte, qui est la limite de sensibilité estimée pour la plupart des mutagènes pertinents dans le test d'Ames. Dans ce cas, le test d'Ames devra être considéré comme insuffisamment pertinent et le potentiel d'induction de mutation génique devra être évalué sur des cellules de mammifères par exemple, à l'aide du test MLA/TK (OCDE 2016b).

devraient être produits en quantité suffisante pour pouvoir étudier leur potentiel toxique in vitro (RBA et/ou neuro-2a).

- ▶ Des études de toxicité relative par rapport à la BTX-3 pour les brevétotoxines majoritaires dans les coquillages devraient être réalisées pour déterminer des facteurs d'équivalence toxique (TEF).
- ▶ L'effet des mélanges de métabolites mériterait d'être investigué.

Concernant les méthodes analytiques, il conviendrait

- ▶ de produire et de rendre disponible un plus grand nombre d'étalons et de matériaux de référence de brevétotoxines et de leurs métabolites ;
- ▶ de développer des méthodes d'analyse physico-chimiques basées sur la spectrométrie de masse et permettant d'ajouter aux brevétotoxines natives leurs métabolites les plus polaires, afin de pouvoir prendre en compte ces derniers lorsqu'ils sont présents dans les coquillages ;
- ▶ de mener des études de validation intra- et inter-laboratoires en bonne et due forme (AOAC ou ISO) afin d'apprécier la fiabilité des méthodes physico-chimiques, biochimiques et biologiques ;
- ▶ Le développement des méthodes analytiques est nécessaire pour la recherche de brevétotoxines dans les échantillons d'urine ou de sang pour confirmer les cas d'intoxication humaine.

Concernant la surveillance

- ▶ Il conviendrait d'étudier la cinétique de contamination/décontamination des coquillages par les brevétotoxines (avec des souches de microalgues productrices de brevétotoxines identifiées en Corse).
- ▶ Une étude écophysiologique des microalgues productrices de brevétotoxines identifiées en Corse est recommandée en vue de déterminer les facteurs environnementaux favorisant la prolifération cellulaire et la production de toxines.
- ▶ L'étude des brevétotoxines dissoutes avec des échantillonneurs passifs (qui donnent une vision intégrative de la situation) permettrait de mieux identifier les zones impactées.
- ▶ Une étude dans les zones ultra-marines (en particulier les Caraïbes) pourrait rechercher la présence de microalgues productrices et de brevétotoxines dans les coquillages.
- ▶ Le GT recommande de rechercher s'il y a des mortalités de poissons associées dans les zones géographiques proches. Il serait pertinent d'analyser des échantillons de poissons prélevés dans la zone impactée par la présence de brevétotoxines (muscles et foies).
- ▶ En cas de survenue de cas d'intoxication alimentaire par les brevétotoxines, un suivi des patients permettrait de détecter un éventuel effet persistant (séquelles).

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DU GT « BREVETOXINES » ET DU CES ERCA

Question 1. Quelles sont les données toxicologiques disponibles pour les brevéttoxines? Permettent-elles à l'Anses de proposer des valeurs toxicologiques de référence aiguë et chronique par voie orale ?

Les données de la littérature sont très limitées concernant l'étude chez l'animal de la toxicité aiguë par voie orale et ne permettent pas d'identifier une dose sans effet néfaste ni une dose minimale avec effets néfastes. Le GT a identifié une seule étude réalisée chez la souris pour déterminer la dose létale à 50 % (DL₅₀) pour la BTX-2 et la BTX-3. La toxicité aiguë a été étudiée par voie intrapéritonéale et intraveineuse pour la BTX-1, la BTX-2 et la BTX-3. Les brevéttoxines induisent des symptômes neurologiques centraux et périphériques, cardiovasculaires, respiratoires : ils se manifestent principalement par des fasciculations musculaires, une ataxie, une réduction de la fréquence respiratoire, des troubles de l'activité cardiaque et une réduction de la température corporelle. Des signes végétatifs – salivation, larmolement, miction et défécation – complètent le tableau neurologique.

Chez l'Homme, l'ingestion de coquillages contaminés par des brevéttoxines peut entraîner un syndrome nommé NSP pour « Neurotoxic Shellfish Poisoning ». Les symptômes débutent généralement entre 1 h et 24 h après l'ingestion et peuvent persister jusqu'à 3 jours. Le syndrome NSP se caractérise principalement par l'apparition de symptômes neurologiques et digestifs. Plus précisément, les signes neurologiques comprennent essentiellement des paresthésies (au niveau des lèvres et extrémités des membres), des vertiges, une asthénie, ainsi qu'une paralysie partielle des membres, des troubles de l'élocution, une perte de coordination et un coma dans les cas les plus graves. Une inversion de la perception de température, une mydriase ainsi que des troubles cardio-vasculaires (bradycardie, hypotension artérielle) ont également été rapportés. Les signes digestifs incluent des douleurs abdominales, nausées, vomissements et diarrhées. Aucun décès lié aux brevéttoxines n'a été rapporté à ce jour.

Quelques centaines de cas d'intoxications alimentaires ont été décrits et publiés dans des revues scientifiques internationales. Ils sont survenus en Floride, en Caroline du Nord, en Nouvelle-Zélande et au Mexique. Aucun cas lié à la consommation de poissons n'a été rapporté à ce jour.

Le faible nombre de ces événements peut être expliqué par la mise en place d'une réglementation relative à la commercialisation des coquillages via une surveillance de la présence des cellules de *K. brevis* le long de la côte Est américaine en particulier du Golfe du Mexique, ainsi qu'en Australie/Nouvelle-Zélande.

A partir des données de cas d'intoxications humaines liées à la consommation de coquillages contaminés par les brevéttoxines, le GT a identifié deux doses minimales associées à des symptômes (« LOAEL aiguës ») : celle de 27-40,5 US/personne sur la base de Mc Farren et al. (1965) et celle de 0,3-0,4 US/kg pc rapportée par Hemmert (1975). En équivalent BTX-3, les LOAEL seraient de 92-138 µg eq. BTX3/personne sur la base de Mc Farren et al. (1965) et 1,02-1,36 µg eq BTX-3/kg p.c sur la base Hemmert (1975). Ces données sont toutefois trop limitées pour pouvoir établir une valeur toxicologique de référence aiguë (ARfD).

Les données de génotoxicité disponibles ont été estimées de qualité insuffisante pour pouvoir conclure.

Compte tenu de la similitude entre les brévétotoxines et les ciguatoxines, des neurotoxines responsables de la ciguatera dont les effets peuvent perdurer pendant des mois voire des années après exposition aiguë, le GT estime que des effets à long terme faisant suite à une exposition aiguë aux brévétotoxines ne peuvent pas être exclus.

A la connaissance du GT, aucune étude de toxicité par administration orale répétée n'est disponible, il n'est donc pas possible de proposer une valeur toxicologique de référence chronique.

Les informations sont également manquantes concernant le potentiel toxique des brévétotoxines sur la reproduction et le développement.

Question 2. Sur la base des données toxicologiques identifiées par l'Anses, est-il possible de proposer une valeur guide dans les coquillages au-delà de laquelle des investigations complémentaires seraient demandées dans le cadre du dispositif EMERGTOX ?

Afin d'évaluer le niveau de protection apporté par la teneur maximale de 20 US/100 g (800 µg BTX-2/kg de chair de coquillages), le GT a comparé l'exposition liée à la consommation de coquillages contaminés à ce niveau avec les 2 « LOAEL aiguës » identifiées, sur la base de plusieurs hypothèses de consommation.

Le GT a retenu la BTX-3 comme BTX de référence dans les coquillages (et non la BTX-2). La BTX-3 est la brévétotoxine de référence pour le test ELISA, elle présente une DL₅₀ plus faible que celle de la BTX-2. De plus, la BTX-2 est minoritaire dans les coquillages, en comparaison avec la BTX-3.

Sur la base de la « LOAEL aiguë » de **0,3-0,4 US/kg p.c.** rapportée par Hemmert (1975), avec l'hypothèse d'un poids corporel de 70 kg et d'une consommation par défaut protectrice de 400 g de chair de coquillages, le GT a calculé une teneur de 52,5-70 US/kg de chair de coquillages. Selon Baden et Menden (1982), 1 US = 3,4 µg BTX-3, ce qui correspondrait à une concentration de **179-238 µg eq. BTX-3/kg de chair de coquillages** (donc 3 à 4 fois plus faible que la limite de 800 µg BTX-2/kg correspondant à 680 BTX-3/kg de chair de coquillages).

Sur la base de la « LOAEL aiguë » de **27-40,5 US/personne** calculée par le GT à partir de l'étude de Mc Farren et al. (1965), avec l'hypothèse d'une consommation par défaut protectrice de 400 g de chair de coquillages, le GT a calculé une teneur de 67,5-101,25 US/kg de chair de coquillages, soit **230-344 µg eq. BTX-3/kg de chair de coquillages** (donc 2 à 3 fois plus faible que la limite de 800 µg BTX-2/kg correspondant à 680 BTX-3/kg de chair de coquillages).

Le GT estime que la teneur maximale de 800 µg BTX-2/kg de chair de coquillages n'apparaît pas suffisamment protectrice et recommande **une valeur guide de 180 µg eq. BTX-3/kg de chair de coquillages (correspondant à la somme de l'ensemble des métabolites de BTX recherchés).**

Question 3. Quelles modalités de suivi des brevétotoxines dans le milieu marin pourraient être recommandées dans le cadre du dispositif EMERGTOX ? Quelles investigations complémentaires seraient à réaliser en cas de dépassement de la valeur guide ?

Suivi des microalgues productrices de brevétotoxines

Depuis 2008, la majorité des prélèvements d'eau pour le REPHY est réalisée en sub-surface (un mètre en dessous de la surface). Le GT recommande de mettre en place une procédure de prélèvement qui intégrerait la colonne d'eau. Cette recommandation n'est pas spécifique à cette saisine portant sur les brevétotoxines.

La fréquence appliquée par le REPHY (quinzaine en routine, hebdomadaire en cas de dépassement du seuil d'alerte pour les microalgues productrices de phycotoxines réglementées) semble adaptée : en effet, les prélèvements de coquillages dans le cadre d'EMERGTOX étant mensuels, il y a au moins deux prélèvements d'eau précédant celui de coquillages.

Les données disponibles à ce jour sont insuffisantes pour pouvoir proposer une concentration seuil de microalgues (nombre de cellules par litre) applicable en France (plus particulièrement en Corse, seule zone touchée par les brevétotoxines en France métropolitaine à ce jour) dans le cadre d'EMERGTOX.

Pour pallier l'absence de seuil d'alerte pour *Karenia* spp en France, le GT recommande de passer à une fréquence hebdomadaire de prélèvement d'eau en cas de quantification de brevétotoxines dans les coquillages sur un lieu donné.

Concernant les analyses de l'eau, en premier lieu il s'avère nécessaire d'avoir un prélèvement d'eau brute non fixé pour pouvoir observer les cellules vivantes. En deuxième lieu, en cas de détection d'espèces cibles, il sera fait appel à une structure experte en taxinomie des microalgues.

En cas de détection de brevétotoxines dans les coquillages et compte tenu de la difficulté à identifier par microscopie optique les espèces de microalgues productrices de brevétotoxines (en particulier pour différencier *K. brevis* de *K. papilionacea*) le GT recommande l'utilisation de la biologie moléculaire (amplification par PCR de plusieurs marqueurs moléculaires, au niveau des régions D1-D2 du 28S ADNr, V4 du 18S ADNr ainsi que la région intergénique ITS2).

Par ailleurs, concernant la situation en Corse, le GT recommande :

- ▶ d'isoler et de mettre en culture les espèces de microalgues potentiellement productrices de brevétotoxines ;
- ▶ de rechercher la présence potentielle de microalgues productrices de brevétotoxines sur le ou les autre(s) site(s) de production conchylicole, y compris en mer ouverte ;
- ▶ de déterminer un seuil d'alerte en microalgues productrices de brevétotoxines (qui déclencherait des analyses de brevétotoxines dans les coquillages).

Suivi des brevétotoxines dans les coquillages

Le GT recommande une valeur guide de 180 µg eq. BTX-3/kg de chair de coquillages pour la somme de l'ensemble des métabolites de BTX recherchés.

En cas de dépassement de cette valeur guide dans des moules ou des huîtres en Corse (espèces suivies dans EMERGTOX au point de Diana, seule zone touchée par les brevétotoxines en France métropolitaine à ce jour), le GT recommande :

- ▶ de faire une information active auprès des professionnels de santé pour renforcer la détection de cas potentiels d'intoxication ;
- ▶ de rechercher les brevétotoxines dans les autres espèces de coquillages produits sur la zone concernée ;
- ▶ de rechercher la présence potentielle de brevétotoxines dans les coquillages sur le ou les autre(s) site(s) de production conchylicole, y compris en mer ouverte.

Par ailleurs, le GT recommande d'identifier les périodes à risque en Corse au cours desquelles la fréquence de prélèvement des coquillages pourrait être renforcée.

En cas de pêche récréative dans la zone géographique à proximité, le GT recommande que ces résultats soient pris en compte par le gestionnaire du risque.

Ces recommandations s'appliquent aussi en cas de dépassement de cette valeur guide dans des coquillages d'autres zones de production que la Corse.

Actuellement, dans le cadre du réseau EMERGTOX, seules les BTX-2 et BTX-3 sont recherchées *via* la méthode multi-toxines en LC-MS/MS qui cible plusieurs groupes de toxines lipophiles réglementées et non réglementées au niveau européen. La mise en évidence des brevétotoxines en France depuis 2018 doit conduire à élargir la recherche à d'autres brevétotoxines.

Le GT recommande de mettre en place des approches complémentaires :

- ▶ un test ELISA pour le criblage des brevétotoxines de type B produites par les microalgues et des métabolites formés dans la chair des coquillages. Cette approche permet de prendre en compte les brevétotoxines non analysables par LC-MS/MS faute de disponibilité commerciale des substances de référence correspondantes ;
- ▶ une méthode d'analyse physico-chimique ciblée spécifique aux brevétotoxines dont les étalons sont disponibles en utilisant la LC-MS/MS. Le GT recommande par ailleurs de développer une méthode d'analyse permettant la recherche dans les coquillages les métabolites des brevétotoxines moins lipophiles, afin de pouvoir, le cas échéant, les prendre en compte ;
- ▶ une analyse non ciblée utilisant la LC-HRMS pour disposer d'informations spectrales permettant de cerner d'éventuelles nouvelles brevétotoxines et/ou nouveaux métabolites ou produits de dégradation.

La liste des métabolites que le GT propose comme prioritaires est constituée de : BTX-1, BTX-2, BTX-3, BTX-B1, BTX-B2, S-désoxy-BTX-B2, BTX-B3, BTX-B4(a et b).

Le GT recommande que les analyses soient réalisées sur chair totale plutôt que sur la glande digestive (pour être plus représentatif à des fins d'évaluation des risques).

Suivi épidémiologique

Le GT Toxines naturelles de la Direction des alertes et des vigilances sanitaires (DAVS) de l'Anses a élaboré début 2021 une fiche de signalement pour les Centres Antipoison et de Toxicovigilance (CAPTV) afin de recenser les cas d'intoxication par des biotoxines marines. Les brevétotoxines sont incluses à cette fiche, qui sera complétée dans un second temps pour les aspects liés à l'exposition aux brevétotoxines par inhalation et contact cutanéomuqueux.

Question 4. Compte tenu des données toxicologiques et au vu du contexte, existe-t-il une préoccupation de santé publique aux niveaux de contamination identifiés dans certaines zones marines françaises liée à la consommation de coquillages ?

Depuis la recherche des brévétotoxines dans le réseau EMERGTOX début 2018, des concentrations quantifiées ont été rapportées uniquement dans des moules de l'étang de Diana (Corse). La concentration maximale rapportée à ce jour est de 345 µg/kg de glande digestive pour la somme de BTX-2 et BTX-3 (novembre 2020) ce qui correspond⁴ à une valeur estimée à 57 µg/kg de chair totale pour la somme de BTX-2 et BTX-3).

Le GT note que les concentrations des deux brévétotoxines dans les coquillages ont augmenté de 20 µg/kg de chair total en novembre 2018, 44 µg/kg en janvier 2019 à 57 µg/kg en novembre 2020.

Ces données sont trop limitées pour servir de base à une estimation de l'exposition alimentaire du consommateur.

Les concentrations sont inférieures à la nouvelle valeur guide proposée par le GT (de 180 µg eq. BTX-3/kg de chair de coquillages), mais le GT souligne qu'il peut y avoir une sous-estimation de la teneur totale en brévétotoxines du fait que seules deux brévétotoxines sur l'ensemble des métabolites potentiellement toxiques ont été analysées dans EMERGTOX.

C'est pourquoi le GT recommande d'élargir dès que possible la prise en compte des BTX suivantes pour l'analyse par couplage LC-MS multidimensionnel ou haute résolution : BTX-1, BTX-2, BTX-3, BTX-B1, BTX-B2, S-désoxy-BTX-B2, BTX-B3, BTX-B4(a et b).

Ainsi, le GT estime qu'une préoccupation sanitaire après exposition aiguë ne peut pas être exclue.

Enfin, le GT ne peut pas se prononcer sur les potentiels effets liés à une exposition répétée à des concentrations faibles.

5. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions du groupe de travail « Brévétotoxines » et du Comité d'experts spécialisé « Evaluation des risques physico-chimiques dans les aliments » (CES ERCA).

Ces travaux d'expertise constituent une avancée pour la prise en compte des brévétotoxines dans les coquillages en France. Bien que ces biotoxines marines constituent un risque avéré en Floride particulièrement, mais également en Australie/Nouvelle-Zélande et au Mexique, il s'agit d'un risque émergent en France et plus largement en Europe, où elles ne sont pas réglementées. C'est grâce au réseau de veille d'émergence des biotoxines marines dans les coquillages (EMERGTOX), mis en place par la DGAL, que les brévétotoxines ont été détectées pour la première fois dans des coquillages français en novembre 2018.

L'analyse des données de la littérature a permis de proposer une valeur guide dans les coquillages, exprimée en équivalent BTX-3 pour la somme de l'ensemble des brévétotoxines

⁴ En faisant l'hypothèse que les BTX se concentrent uniquement dans la glande digestive et sur la base de résultats préliminaires réalisés en 2018 et 2019 sur la chair totale.

recherchées, en combinant deux approches analytiques complémentaires, l'ELISA et la LC-MS/MS.

A ce jour, les brevétotoxines ont été détectées dans des coquillages français uniquement en Corse, à l'étang de Diana. L'Agence recommande donc de prioriser les efforts de recherche pour mieux comprendre cette situation afin d'identifier la ou les espèces de microalgues productrices, proposer un seuil d'alerte (en nombre de cellules dans l'eau) et caractériser le profil toxinique.

Afin de pouvoir élaborer une valeur toxicologique de référence aiguë, l'Agence identifie également comme action prioritaire la réalisation d'une étude de toxicité orale aiguë chez le rongeur selon la ligne directrice 424 de l'OCDE pour l'étude de la neurotoxicité.

Grace aux travaux menés par le groupe de travail sur les toxines naturelles de la Direction des alertes et des vigilances sanitaires (DAVS) de l'Anses, une fiche de signalement a été élaborée début 2021 pour les Centres Antipoison et de Toxicovigilance (CAPTV) afin de recenser les cas d'intoxication liés à la consommation de coquillages contaminés par des biotoxines marines. Les brevétotoxines sont incluses dans cette fiche, ce qui devrait faciliter le recueil de cas et estimer plus précisément le niveau de préoccupation sanitaire lié aux brevétotoxines en France.

Dr Roger Genet

MOTS-CLÉS

Brévétoxines, toxines émergentes, biotoxines marines, coquillages, *Karenia sp.*, Raphidophytes, toxicité, occurrence

Brevetoxins, emerging toxins, marine biotoxins, shellfish, Karenia sp., Raphidophytes, toxicity, occurrence

BIBLIOGRAPHIE

Se reporter au rapport d'expertise collective

CITATION SUGGÉRÉE

Anses (2021). Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail sur l'état des connaissances relatives aux brévétoxines dans les coquillages, données de toxicité, d'occurrence et microalgues productrices (saisine 2020-SA-0020). Maisons-Alfort : Anses, 19 p. L'avis est accompagné d'un rapport d'expertise collective.

ANNEXE

Suivi des actualisations de l'avis.

Le texte barré a été retiré et le texte en italique a été ajouté.

Date	Page	Description de la modification
02/03/2021		Première version de l'avis
Décembre 2021	3	3.2.1. Liste des brévétoxines pour l'expertise Sur la base des données de toxicité, d'occurrence dans les coquillages et de la disponibilité des étalons, la liste des brévétoxines (BTX) que le GT propose de considérer comme prioritaires est constituée de : BTX-1, BTX-2, BTX-3, BTX-B1, BTX-B2, désoxy-BTX-B2 , S-désoxy-BTX-B2, sulfoxyde-BTX-B2 , BTX-B3, BTX-B4(a et b).
	16	La liste des métabolites que le GT propose comme prioritaires est constituée de : BTX-1, BTX-2, BTX-3, BTX-B1, BTX-B2, désoxy-BTX-B2 , S-désoxy-BTX-B2, sulfoxyde-BTX-B2 , BTX-B3, BTX-B4(a et b).
	17	C'est pourquoi le GT recommande d'élargir dès que possible la prise en compte des BTX suivantes pour l'analyse par couplage LC-MS multidimensionnel ou haute résolution : BTX-1, BTX-2, BTX-3, BTX-B1, BTX-B2, désoxy-BTX-B2 , S-désoxy-BTX-B2, sulfoxyde-BTX-B2 , BTX-B3, BTX-B4(a et b).

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 22 décembre 2021

AVIS

de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

**sur l'état des connaissances relatives à l'exposition aux brevétotoxines par
inhalation d'embruns ou par contact direct avec de l'eau contaminée en cas de
baignade ou de pratique d'activités nautiques**

*L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.
L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail
et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.
Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé
des végétaux et d'autre part à l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.
Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui
scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en
œuvre des mesures de gestion du risque (article L. 1313-1 du code de la santé publique).
Ses avis sont publiés sur son site internet.*

L'Anses a été saisie le 14 janvier 2020 par la direction générale de l'alimentation (DGAL) et la direction générale de la santé (DGS) pour la réalisation d'une expertise quant à la toxicité aiguë et chronique des brevétotoxines susceptibles d'exposer les personnes à un risque par ingestion, par inhalation ou par contact.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Les brevétotoxines correspondent à une famille de biotoxines marines comprenant de nombreux métabolites. Elles sont produites principalement par le dinoflagellé *Karenia brevis* (ancien nom : *Gymnodinium breve* et *Ptychodiscus brevis*), connu pour être à l'origine de « marées rouges » lors d'épisodes d'efflorescence. En France, les brevétotoxines font l'objet d'une surveillance dans le cadre du réseau de veille d'émergence des biotoxines marines dans les coquillages (EMERGTOX) depuis janvier 2018.

Elles ont été détectées pour la première fois en France en novembre 2018 dans des moules de l'étang de Diana en Corse. Le prélèvement d'eau associé pour le suivi du phytoplancton a montré la présence de *Karenia* spp. (genre de microalgues dont certaines espèces produisent des brevétotoxines) mais l'espèce *Karenia brevis* n'a pas été spécifiquement mise en évidence. Par ailleurs, plusieurs espèces de dinoflagellés suspectées, d'après la littérature, d'être producteurs potentiels de composés bioactifs de type brevétotoxines sont présents de façon récurrente sur l'ensemble des côtes françaises métropolitaines depuis plusieurs années.

Dans ce contexte, il a été demandé à l'Anses de fournir des éléments de réponse aux questions suivantes :

Question 1. Quelles sont les données toxicologiques disponibles pour les brévétoxines ? Permettent-elles à l'Anses de proposer des valeurs toxicologiques de référence aiguë et chronique par voie orale ?

Question 2. Sur la base des données toxicologiques identifiées par l'Anses, est-il possible de proposer une valeur guide dans les coquillages au-delà de laquelle des investigations complémentaires seraient demandées dans le cadre du réseau EMERGTOX ?

Question 3. Quelles modalités de suivi des brévétoxines dans le milieu marin pourraient être recommandées dans le cadre du réseau EMERGTOX ? Quelles investigations complémentaires seraient à réaliser en cas de dépassement de la valeur guide ?

Question 4. Compte tenu des données toxicologiques et au vu du contexte, existe-t-il une préoccupation de santé publique aux niveaux de contamination identifiés dans certaines zones marines françaises liée à la consommation de coquillages ?

Question 5. Existe-t-il une préoccupation sanitaire liée à l'exposition aux brévétoxines par un contact direct avec de l'eau contaminée notamment en cas de baignade ou de pratique d'activités nautiques ou en cas d'exposition par inhalation à des embruns ?

Les réponses aux quatre premières questions ont fait l'objet d'un avis de l'Anses¹, accompagné d'un rapport d'expertise intitulé « État des connaissances relatives aux brévétoxines dans les coquillages, données de toxicité, d'occurrence et microalgues productrices ».

Le présent avis vise à répondre à la cinquième question relative à l'exposition *via* les embruns ou *via* le contact direct avec de l'eau contaminée lors de la pratique de la baignade ou d'autres activités de loisirs nautiques.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'Anses a confié l'instruction de la question relative à l'exposition par inhalation ou contact cutanéomuqueux à cinq rapporteurs compétents dans le domaine des aérosols et des brévétoxines.

Les travaux d'expertise se sont basés sur une revue de la littérature. Deux bases de données (Scopus et Pubmed) ont été interrogées entre novembre 2020 et février 2021 ce qui a permis d'identifier 155 références en lien avec la question posée.

Les principales informations issues de cette recherche ont été présentées pour validation au CES « Eaux » (tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques) lors des réunions plénières du 6 avril 2021, du 1^{er} juin 2021 et du 6 juillet 2021. Le présent avis tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES « Eaux ». Les travaux d'expertise ont été adoptés par le CES « Eaux » le 6 juillet 2021 à l'unanimité des experts présents.

¹ Avis sur l'état des connaissances relatives aux brévétoxines dans les coquillages, données de toxicité, d'occurrence et microalgues productrices (avis du 2 mars 2021 révisé).

Ces travaux sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires.

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet : <https://dpi.sante.gouv.fr/>.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DES RAPPORTEURS

K. brevis est une espèce principalement présente dans le golfe du Mexique. Elle se développe du Mexique à la Floride mais elle est particulièrement fréquente sur la côte ouest de la Floride (Tester et al. 1997 ; Patel 2020). La majorité des études retenues pour réaliser cette expertise ont été réalisées en Floride et se sont concentrées sur l'espèce *K. brevis*.

Les efflorescences de *K. brevis* peuvent être peu étendues ou occuper de grandes surfaces (jusqu'à 6000 km²) (Patel, 2020), présenter de faibles à de très fortes concentrations (de moins de 1000 cell.L⁻¹ à plusieurs millions cell.L⁻¹) et persister de quelques jours à plusieurs mois dans l'eau (Tester 1997 ; Patel 2020).

La présence des brévéttoxines (BTX) a été identifiée dans l'eau, dans les aérosols marins, dans l'eau de pluie et le sable (Cheng, 2005 a et b ; Pierce 2000, 2005, 2008, 2011 ; Buttke 2018 ; Castle, 2013).

3.1. Contamination du milieu aquatique

La contamination des milieux aquatiques survient principalement après la lyse des cellules. Lors de la lyse cellulaire de *K. brevis*, différents analogues de BTX sont alors libérés dans la colonne d'eau. La quantité moyenne de BTX produite *in situ* par *K. brevis* est comprise entre 8 et 30 pg par cellule (Baden et Tomas 1988 ; Pierce et al. 2000).

Un bilan des études menées sur les plages de Sarasota en Floride durant les années 2000 a montré que les concentrations en BTX totales détectées par des tests ELISA dans l'eau de mer (sous forme intracellulaire ou solubilisée) peuvent varier entre 2,25 et 69 µg.L⁻¹ pour des densités cellulaires comprises entre 200 000 et 1 million de cellules par litre (Fleming et al. 2005, 2007, 2009; Milian et al. 2007 ; Kirkpatrick, 2011). Sur ce site, la BTX-2 est l'analogue mesuré en plus grande concentration dans l'eau suivi de BTX-1 et de BTX-3.

La concentration des analogues dans l'eau de mer varient selon la phase du cycle des efflorescences (croissance, stationnaire ou déclin), l'intensité des efflorescences, le site où elle se développe et les conditions environnementales (Baden et Tomas, 1988 ; Baden et al., 2005, Pierce, 2003, 2008, 2011). Les analogues BTX-2 et BTX-3 par exemple semblent être présents à des concentrations plus élevées dans l'écume (respectivement 1900 µg.L⁻¹ et 1200 µg.L⁻¹) que dans la colonne d'eau (zone de déferlement-respectivement 20 µg.L⁻¹ et 4 µg.L⁻¹) (Pierce, 2003). Enfin, les concentrations en BTX-3 augmentent dans l'eau au cours des efflorescences pour devenir majoritaires en fin d'efflorescences (Pierce et al. 2008), ce qui semble indiquer une conversion de BTX-2 en BTX-3 lorsque les cellules sont lysées.

3.2. Brévéttoxines et aérosols

Les aérosols marins sont issus de l'interaction entre le vent et les vagues. Les frottements du vent à la surface de la mer ou de l'océan engendrent de la turbulence mécanique à l'origine de la formation et du développement des vagues (Demoisson 2014). La taille des vagues est déterminée par l'intensité et la durée du vent ainsi que par la distance sur laquelle il souffle, la topographie des fonds et la forme de la plage. Lorsque la vitesse du vent est supérieure à 5

m.s⁻¹, des vagues sont formées à la surface des océans. Ces vagues grandissent puis déferlent. Quand une vague déferle, de l'air est entraîné sous la surface de l'eau (jusqu'à 10 m de profondeur) et forme, en remontant à la surface, un nuage de bulles (Demoisson 2014 ; Claeys 2016). Les bulles formées sont les premières responsables des émissions d'aérosols marins lorsqu'elles éclatent à la surface (Blanchard et Woodcock 1980 ; Demoisson 2014). Lorsque les bulles remontent à la surface, elles peuvent s'enrichir de matières, dissoutes ou particulaires (Blanchard, 1989).

La concentration en BTX dans les aérosols collectés sur la plage dépend de la concentration en BTX présente dans la zone de déferlement, de la vitesse et de la direction du vent ainsi que de l'exposition de la plage (Pierce 2003 ; Backer 2003 ; Cheng 2005). En fonction de la localisation des efflorescences à la surface de l'eau (« surf zone », vagues déferlantes) et de la force et vitesse du vent, les concentrations en BTX dans les aérosols varient, de même que leur distribution sur la plage et dans les terres.

L'analyse des aérosols sur la plage de Sarasota en Floride lors de plusieurs épisodes d'efflorescences de *K. brevis* indique que la taille des particules est comprise entre 5 et 12 µm et que ces aérosols contiennent des brévétotoxines (Cheng et al., 2005). Comme dans les échantillons d'eau, les analogues BTX-1, -2, -3 et -B5 sont majoritairement retrouvés dans les aérosols. Tout comme dans la colonne d'eau, la composition en BTX dans les aérosols varie au cours des phases de l'efflorescence (Roszell, 1989). Pendant les phases stationnaires et décroissantes de l'efflorescence, les concentrations de BTX-1 et BTX-2 dans l'air diminuent considérablement et celles de BTX-3 augmentent.

3.3. Exposition aux brévétotoxines

L'exposition aux BTX lors de la pratique d'activités professionnelles ou de loisirs à proximité ou sur la plage peut se faire *via* le contact direct avec de l'eau contaminée ou *via* l'inhalation d'embruns.

Plusieurs études décrivent les symptômes observés lors de l'exposition à des embruns contenant des BTX : éternuements, rhinorrhée et irritation de la gorge (Milan 2007 ; Fleming 2009 ; Cheng et al. 2004; Cheng et al. 2005a; Cheng et al. 2005b; Fleming et al. 2005a; Fleming et al. 2007b; Milian et al. 2007; Pierce et al. 2003; 2005; 2008). Les symptômes apparaissent de quelques minutes à quelques heures (< 24 h) après l'exposition et se résorbent généralement dès que les individus quittent la zone contaminée. La localisation anatomique des symptômes suggère un dépôt de BTX dans les voies aériennes supérieures. Les symptômes se déplacent des parties supérieures vers les parties inférieures de l'arbre respiratoire et s'accroissent en fonction de l'augmentation de la concentration en BTX dans l'air (Backer et al. 2003). Une exposition à des concentrations atmosphériques de l'ordre de 3 à 5 ng.m⁻³ sont suffisantes pour observer des symptômes des voies respiratoires supérieures. Des concentrations en BTX de 30 à 40 ng.m⁻³ sont nécessaires pour provoquer des symptômes en lien avec une atteinte des voies respiratoires inférieures, notamment chez les personnes asthmatiques.

Les irritations respiratoires ne sont pas les seuls symptômes observés lors d'une efflorescence de *K. brevis*. Les aérosols contaminés par des BTX qui se déposent sur le visage et la peau peuvent également causer des irritations cutanées et oculaires (Kirkpatrick 2004).

L'ensemble de la population peut être sujette à de tels symptômes mais les professionnels qui travaillent dans des zones contaminées ont plus de chance de se trouver exposés aux BTX. Les personnes asthmatiques et celles présentant des problèmes respiratoires chroniques semblent être des populations plus sensibles à ce type d'exposition. De même, les femmes enceintes pourraient constituer une population sensible qui devrait éviter la fréquentation des plages lors d'épisodes d'efflorescences de *K. brevis* au regard des résultats de Benson (2006)

qui a montré expérimentalement le transfert de brevéttoxines vers le placenta de souris en gestation lors de l'exposition par aérosol.

Les études concernant l'exposition par contact avec de l'eau contaminée par des cellules *K. brevis* et/ou par des BTX sont parcellaires. Aucune étude décrivant une exposition aux BTX durant la pratique d'une activité de loisirs nautiques n'a été recensée dans le cadre de la revue de la littérature. En revanche des irritations cutanées ont été observées chez des scientifiques prélevant de l'eau et des bivalves à proximité d'une efflorescence (Cummins et al. 1971).

3.4. Toxicité chez l'animal

Les données de la littérature relative à l'étude chez l'animal de la toxicité des brevéttoxines par inhalation sont peu nombreuses. Si des effets irritants ont pu être observés chez les animaux et en particulier chez des animaux asthmatiques (brebis), les doses testées chez les animaux sont largement supérieures (plusieurs centaines de mg.m^{-3}) à celles mesurées sur les plages (quelques dizaines de ng.m^{-3}). Les résultats obtenus chez les animaux ne sont pas transposables en l'état actuel à l'Homme.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DU CES EAUX

À ce jour, aucune efflorescence liée aux *Karenia brevis* n'a été identifiée sur les côtes françaises métropolitaines ou ultramarines. Le suivi systématique de cette microalgue et/ou des brevéttoxines dans le cadre du contrôle sanitaire des eaux de baignades en eau de mer n'est donc pas préconisé.

En revanche, compte tenu de la présence sur les côtes françaises métropolitaines de différents producteurs potentiels de brevéttoxines, le CES « Eaux » recommande la mise en place d'un système de surveillance participative, par des acteurs de terrain (association sportive, maître-nageur, etc.) basée sur une surveillance visuelle de la variation de la coloration de l'eau. Un tel système de surveillance a déjà fait ses preuves lors du suivi des cyanobactéries en eau douce (Mitroi et al. 2020).

De plus, la présence de BTX dans les eaux marines françaises étant une problématique émergente peu connue des professionnels de santé et de la population générale, le CES « Eaux » propose que dans le cadre de la toxicovigilance, une note d'information soit rédigée par l'Anses, afin d'informer le réseau des Centres antipoison de l'émergence des BTX et des risques sanitaires encourus, sur le littoral français lors d'une exposition par inhalation d'embruns ou par contact cutané ou ingestion d'eau lors de la pratique d'activités nautiques.

Enfin, dans un contexte de réchauffement climatique qui pourrait favoriser les conditions de développement des espèces productrices de brevéttoxines, le développement d'efflorescence de *Karenia brevis* le long des côtes françaises métropolitaines ou ultramarines n'est pas à exclure. De ce fait, **les experts préconisent, si une efflorescence de ces microalgues est mise en évidence sur les côtes françaises, d'instaurer les mesures de gestion suivantes :**

- Identifier les espèces présentes dans l'efflorescence ;
- Si la présence de producteur de brevéttoxines est avérée :
 - estimer les abondances cellulaires et les concentrations en toxines dans l'eau et dans l'air ;
 - interdire la baignade et la pratique des activités de loisirs nautiques à proximité de l'efflorescence ;
 - recommander le port de protections respiratoires (masques chirurgicaux ou FFP2) à proximité des plages affectées ;

- informer les populations à risque et notamment les personnes asthmatiques, celles présentant des troubles respiratoires chroniques ainsi que les femmes enceintes des risques liés à la présence d'efflorescence de ces microalgues;
- en cas de contact avec ces microalgues et de sensation d'irritation, sortir de l'eau et se rincer soigneusement avec de l'eau ;
- sensibiliser les professionnels de santé susceptibles de rencontrer des personnes présentant des symptômes évocateurs d'une intoxication par les BTX (médecins généralistes, urgentistes, SAMU, CAPTV).

Acquisition de connaissances

Les BTX sont une problématique émergente en France. Il est nécessaire de développer des connaissances concernant cette famille de biotoxines marines et ses producteurs afin de disposer de données robustes permettant de prendre des mesures de gestion applicables immédiatement en cas d'apparition d'une « marée rouge » sur les côtes continentales ou ultramarines. Les experts recommandent donc d'acquérir des données et de poursuivre les travaux d'études et de recherche sur les points suivants :

- occurrence des différentes espèces de producteurs potentiels de BTX dans les territoires ultramarins ;
 - suivi environnemental des sites de baignade situés à proximité des points de surveillance du REPHY² où des producteurs potentiels de BTX ont été détectés dans le passé. Ces prélèvements réguliers d'eau et d'air permettraient de recueillir des données afin de définir, par la suite, si un risque lié à la présence de brévéttoxines existe en France dans les eaux récréatives marines et/ou dans les embruns ;
 - amélioration de la compréhension des conditions de développement des différentes espèces productrices de brévéttoxines ;
 - comparaison de l'efficacité des différents types de masque par rapport à l'exposition aux BTX selon la population visée (population générale, professionnel, personne asthmatique, etc.) ;
 - développement d'études pour caractériser la protection individuelle suffisante pour protéger les personnes sensibles en cas d'efflorescence.
-
- **Concernant la toxicité**
 - poursuivre les études d'exposition par inhalation chez les animaux de laboratoire en recherchant l'ensemble des signes d'intoxication (neurotoxiques, musculaires, cardiovasculaires, thermiques) observés avec d'autres voies d'exposition (oral, i.p) ;
 - mettre en place des études pour déterminer les effets d'une exposition par contact cutané-muqueux d'une eau contaminée par les brévéttoxines ;
 - mettre en place une étude pour déterminer les effets d'une exposition par contact cutané aux aérosols contaminés ;
 - mieux comprendre la toxicité des analogues de brévéttoxines pour une exposition à court, moyen et long terme *via* le contact cutané-muqueux ou l'inhalation.
 - **Concernant la surveillance des eaux marines récréatives**
 - approfondir les recherches, en association avec les observations satellites menée par le REPHY, sur l'utilisation de la chlorophylle et des profils pigmentaires comme indicateur d'une efflorescence de *K. brevis* ;

² REPHY : Réseau d'observation et de surveillance du phytoplancton et de l'hydrologie dans les eaux littorales.

- développer une base de données communes au REPHY, à la directive cadre sur le milieu marin, Sise baignade³ qui permettrait de mutualiser les informations relatives à la qualité des eaux de baignade et de prévoir l'apparition de dangers émergents dans les eaux récréatives françaises.

5. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions du Comité d'experts spécialisé « Eaux ».

L'Agence rappelle qu'à ce jour, *Karenia brevis* n'a pas été observé dans les eaux littorales françaises dans le cadre de la surveillance nationale (REPHY).

Toutefois, les changements climatiques pourraient conduire à l'introduction puis au développement de cette espèce dans les eaux françaises. De même le biofouling⁴ pourrait également représenter une source de déplacement des espèces productrices de brevétocines dans ces eaux. Par anticipation d'une possible future efflorescence, l'Agence recommande de prioriser les efforts de recherche pour l'acquisition de connaissances sur cette problématique, en particulier l'identification de la ou les espèces de microalgues productrices, en vue notamment de proposer un seuil d'alerte, en appui à la définition de mesures de gestion adaptées.

Roger Genet

³ Sise-baignade : système d'information sur les eaux de baignade

⁴ Biofouling : colonisation de toute surface (vivante ou non) en milieu aqueux par des organismes vivants

MOTS-CLÉS

Brévétoxines, *Karenia brevis*, toxines émergentes, biotoxines marines, eau de mer, eau de baignade, aérosols, inhalation

Brevetoxins, Karenia brevis, emerging toxins, marine biotoxins, sea water, recreational water, aerosols, inhalation

BIBLIOGRAPHIE

- Baden, D; G, et C. R. Tomas. 1988. "Variations in Major Toxin Composition for Six Clones of *Ptychodiscus Brevis*." *Toxicon* 26 (10) : 961-963. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(88\)90261-9](https://doi.org/10.1016/0041-0101(88)90261-9)
- Baden, D., A. Bourdelais, H. Jacocks, S. Micelliza, J Naar 2005. "Natural and Derivative Brevetoxins: Historical Background, Multiplicity, and Effects ". *Environmental Health Perspectives* 113 (5): 621-625.
- Buttke, D. E., A. Walker, I. S. Huang, L. Flewelling, J. Lankton, A. E. Ballmann, T. Clapp, J. Lindsay, et P. V. Zimba 2018. "Green Tree Frog (*Hyla Cinerea*) and Ground Squirrel (*Xerospermophilus Spilosoma*) Mortality Attributed to Inland Brevetoxin Transport at Padre Island National Seashore, Texas, USA, 2015." [In English]. *Journal of Wildlife Diseases* 54(1): 142-146. <https://doi.org/10.7589/2017-01-018>
- Castle, K. T., L. J. Flewelling, J. Bryan, 2nd, A. Kramer, J. Lindsay, C. Nevada, W. Stablein, D. Wong, et J. H. Landsberg. 2013. "Coyote (*Canis Latrans*) and Domestic Dog (*Canis Familiaris*) Mortality and Morbidity Due to a *Karenia Brevis* Red Tide in the Gulf of Mexico." *Journal of Wildlife Disease* 49 (4) : 955-964. <https://doi.org/10.7589/2012-11-299>.
- Cheng, Y. S., J. D. McDonald, D. Kracko, C.M. Irvin , Y. Zhou, R. H. Pierce, M. S. Henry, et al. 2005a."Concentration and Particle Size of Airborne Toxic Algae (Brevetoxin) Derived from Ocean Red Tide Events." [In eng]. *Environmental science & technology* 39 (10): 3443-3449. <https://dx.doi.org/10.1021%2Fes048680j>
- Cheng, Y. S., Y. Zhou, C.M. Irvin., R. H. Pierce, J. Naar, L. C. Backer, L. E. Fleming, Barbara Kirkpatrick, and Dan G. Baden. 2005b."Characterization of Marine Aerosol for Assessment of Human Exposure to Brevetoxins." [In eng]. *Environmental health perspectives* 113 (5): 638-643. <https://dx.doi.org/10.1289%2Fehp.7496>
- Demoisson, A. 2014. "Study of the Source and the Transport of Sea-Spays in the Mediterranean Coastal Zone" Université de Toulon, <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01314438>.
- Fleming, L. E., L. C. Backer, and D. G. Baden. 2005. "Overview of Aerosolized Florida Red Tide Toxins: Exposures and Effects." [In English]. *Environmental Health Perspectives* 113 (5): 618-620. <https://dx.doi.org/10.1289%2Fehp.7501>
- Fleming, L. E., J. A. Bean, B. Kirkpatrick, Y. S. Cheng, R. Pierce, J. Naar, K. Nierenberg, et al. 2009 "Exposure and Effect Assessment of Aerosolized Red Tide Toxins (Brevetoxins) and Asthma." [In eng]. *Environmental health perspectives* 117(7): 1095-1100. <https://dx.doi.org/10.1289%2Fehp.0900673>
- Fleming, L. E., B. Kirkpatrick, L. C. Backer, J. A. Bean, A. Wanner, A. Reich, J. Zaias, et al. 2007 "Aerosolized Red-Tide Toxins (Brevetoxins) and Asthma." [In eng]. *Chest* 131 (1): 187-194. <https://doi.org/10.1378/chest.06-1830>
- Kirkpatrick, B., L. E. Fleming, J. A. Bean, K. Nierenberg, L. C. Backer, Y. S. Cheng, R. Pierce, et al. (2011) "Aerosolized Red Tide Toxins (Brevetoxins) and Asthma: Continued

- Health Effects after 1 Hour Beach Exposure." [In eng]. *Harmful algae* 10 (2) : 138-143. <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.hal.2010.08.005>
- Milian, A., K. Nierenberg, L. E. Fleming, J. A. Bean, A. Wanner, A. Reich, L. C. Backer, D. Jayroe, and B. Kirkpatrick. 2007. "Reported Respiratory Symptom Intensity in Asthmatics During Exposure to Aerosolized Florida Red Tide Toxins." [In English]. *Journal of Asthma* 44 (7) : 583-587. <https://doi.org/10.1080/02770900701539251>
- Patel, S. S., V. J. Lovko, and R. F. Lockey. 2020 "Red Tide: Overview and Clinical Manifestations." *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* 8 (4) : 1219-1223. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2019.10.030>
- Pierce, R.H., M. S. Henry, P. C. Blum, S. E. Osborn, Y.-S. Cheng, Y. Zhou, C. M. Irvin, et al. 2011; "Compositional Changes in Neurotoxins and Their Oxidative Derivatives from the Dinoflagellate, *Karenia Brevis*, in Seawater and Marine Aerosol." [In eng]. *Journal of plankton research* 33 (2) : 343-348.
- Pierce, R. H., et M. S. Henry. 2008. "Harmful Algal Toxins of the Florida Red Tide (*Karenia Brevis*): Natural Chemical Stressors in South Florida Coastal Ecosystems." *Ecotoxicology* 17 (7) : 623-631. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0241-x>
- Pierce, R. H., M.S. Henry, P.C. Blum, S.L. Hamel, B. Kirkpatrick, Y.S. Cheng, Y. Zhou, C.M. Irvin, J. Naar, A. Weidner, L.E. Fleming, L.C. Backer, D.G. Baden, 2005. "Brevetoxin composition in water and marine aerosol along a Florida beach: Assessing potential human exposure to marine biotoxins." *Harmful Algae* 4(6): 965-972. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2004.11.004>
- Pierce, R.H., M. Henry, P. Blum, et S. Payne. 2000 "Gymnodinium Breve Toxins without Cells: Intra-Cellular and Extra-Cellular Toxins." *Harmful algal blooms* : 421-424. Tester, P. A., et K. A. Steidinger. 1997 "Gymnodinium Breve Red Tide Blooms: Initiation, Transport, and Consequences of Surface Circulation." *Limnology and Oceanography* 42, (5) part2: 1039-1051. http://dx.doi.org/10.4319/lo.1997.42.5_part_2.1039

**Etat des connaissances relatives
à l'exposition aux brévéttoxines par la consommation
de coquillages, par l'inhalation d'embruns ou par
contact en cas de baignade ou de pratique
d'activités nautiques**

(Microalgues productrices et données de toxicité)

Saisine n°2020-SA-0020

**RAPPORT
d'expertise collective¹**

**Comités d'experts spécialisés
« Évaluation des risques physico-chimiques dans les aliments »
« Évaluation des risques liés à l'eau »**

Groupe de travail « Brévéttoxines » (coquillages)

Novembre 2021

¹ Ce rapport complète et remplace celui de mars 2021 qui était une version intermédiaire.

Citation suggérée

Anses (2021). Etat des connaissances relatives à l'exposition aux brevétoxines par la consommation de coquillages, par l'inhalation d'embruns ou par contact en cas de baignade ou de pratique d'activités nautiques (saisine n°2020-SA-0020). Maisons-Alfort : Anses, 210 p.

Mots clés

Brévétoxines, toxines émergentes, biotoxines marines, coquillages, *Karenia sp.*, Raphidophytes, toxicité, occurrence, inhalation, embruns, eaux de baignade

Brevetoxins, emerging toxins, marine biotoxins, shellfish, Karenia sp., Raphidophytes, toxicity, occurrence, inhalation, sea spray, recreational water

Présentation des intervenants

PRÉAMBULE : Les experts membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae*, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

GRUPE DE TRAVAIL (BREVETOXINES DANS LES COQUILLAGES, QUESTIONS 1 A 4)

Présidente

Mme Raphaële LE GARREC – Maître de conférences des universités – Compétences en toxicologie, VTR, brevétoxines, neurotoxicité, système nerveux périphérique

Membres

M. Eric ABADIE – Chercheur, Ifremer/UMR MARBEC, Sète – Compétences en écophysiologie et écologie des dinoflagellés, biotoxines marines, Réseau de surveillance et d'observation du phytoplancton et des phycotoxines (REPHY) en Occitanie

M. Zouher AMZIL – Chercheur, Ifremer/Centre Atlantique, Nantes – Compétences en microalgues toxiques et nuisibles, chimie analytique des biotoxines marines, veille d'émergence des biotoxines marines dans les coquillages (EMERGTOX)

Mme Marie-Yasmine BOTTEIN – Chercheuse en toxicologie environnementale – Compétences en toxicologie des biotoxines marines, connaissances sur les brevétoxines, méthodes analytiques, contamination chimique des aliments, écotoxicologie

Mme Katia COMTE – Maître de conférences, MNHN/UMR MCAM, Paris – Compétences en écophysiologie et écologie des protistes photosynthétiques, écotoxicologie, culture, dosage des toxines

M. Nicolas DELCOURT – Maître conférence universitaire – Praticien Hospitalier, Centre antipoison et de toxicovigilance, CHU Purpan/Université de Toulouse – Compétences en biochimie et toxicologie clinique, neurobiologie

M. Vincent HORT – Laboratoire nationale de référence pour les biotoxines marines, Anses, Maisons-Alfort – Compétences en chimie analytique des biotoxines marines, veille d'émergence des biotoxines marines dans les coquillages (EMERGTOX)

M. César MATTEI – Maître de conférences des universités, Angers – Compétences en toxicologie des toxines, système nerveux, récepteurs, neurotoxicité, canaux ioniques

M. Jordi MOLGO – Directeur de recherche émérite, CNRS/CEA, Saclay – Compétences en pharmacologie, neurosciences, biotoxines marines

RAPPORTEURS POUR LES QUESTIONS 1 A 4

Mme Nadine NEAUD-MASSON – Ifremer, Nantes – Coordination du REPHY et REPHYTOX

M. Fabrice NESSLANY - Directeur de laboratoire, Institut Pasteur de Lille - Compétences en toxicologie (génotoxicité)

RAPPORTEURS POUR LA QUESTION 5

M. Zouher AMZIL – Chercheur, Ifremer/Centre Atlantique, Nantes – Compétences en microalgues toxiques et nuisibles, chimie analytique des biotoxines marines, veille d'émergence des biotoxines marines dans les coquillages (EMERGTOX)

Mme Marie-Yasmine BOTTEIN – Chercheuse en toxicologie environnementale – Compétences en toxicologie des biotoxines marines, connaissances sur les brevétoxines, méthodes analytiques, contamination chimique des aliments, écotoxicologie

M. Nicolas DELCOURT – Maître conférence universitaire – Praticien Hospitalier, Centre antipoison et de toxicovigilance, CHU Purpan/Université de Toulouse – Compétences en biochimie et toxicologie clinique, neurobiologie

M. César MATTEI – Maître de conférences des universités, Angers – Compétences en toxicologie des toxines, système nerveux, récepteurs, neurotoxicité, canaux ioniques

Mme Anne OPPLIGER – Responsable de recherche au Centre universitaire de médecine générale et de Santé publique de Lausanne- Compétence en aérosol

COMITÉS D'EXPERTS SPÉCIALISÉS

- Les travaux des questions 1 à 4 ont été suivis et adoptés par le CES « Evaluation des risques physico-chimiques dans les aliments » (CES ERCA) :

Mandat 2018-2021, dates : 5 mars 2020, 7 octobre 2020, 4 novembre 2020, 6 janvier 2021 et 10 février 2021

Président

M. Bruno LE BIZEC - Professeur des universités - Compétences en chimie analytique et en évaluation des risques sanitaires

Vice-présidents

M. Fabrice NESSLANY - Directeur de laboratoire - Compétences en toxicologie

Mme Karine TACK - Chercheuse - Compétences en chimie analytique et environnementale, évaluation des risques sanitaires

Membres

M. Claude ATGIE – Professeur des universités – Compétences en toxicologie

M. Pierre-Marie BADOT - Professeur des universités – Compétences en transfert de contaminants et écotoxicologie

Mme Marie-Yasmine DECHRAOUI BOTTEIN – Chercheuse en toxicologie environnementale – Compétences en biotoxines marines

Mme Martine CLAUW - Professeur des universités - Compétences en toxicologie

M. Nicolas DELCOURT – Maître de conférences des universités – Praticien Hospitalier– Compétences en biochimie et toxicologie clinique

Mme Christine DEMEILLIERS – Maître de conférences des universités – Compétences en toxicologie

M. Erwan ENGEL – Directeur de recherche – Compétences en chimie analytique

M. Jérôme GAY- QUEHEILLARD - Maître de conférences des universités - Compétences en impacts digestifs et métabolisme

M. Petru JITARU – Responsable de Laboratoire – Compétences en chimie analytique

Mme Sonia KHIER – Maître de conférences des universités – Compétences en pharmacocinétique

Mme Emilie LANCE – Maître de conférences des universités – Compétences en écotoxicologie et cyanotoxines

Mme Caroline LANIER – Maître de conférences des universités – Compétences en évaluation des risques sanitaires liés à l'environnement et l'alimentation

Mme Raphaële LE GARREC - Maître de conférences des universités - Compétences en toxicologie

M. Ludovic LE HEGARAT – Chef d'unité adjoint – Compétences en toxicologie

M. Nicolas LOISEAU – Chargé de recherche – Compétences en toxicologie
M. David MAKOWSKI – Directeur de recherche – Compétences en statistiques, modélisation
M. Eric MARCHIONI - Professeur des universités - Compétences en chimie analytique
M. Jean-François MASFARAUD – Maître de conférences des universités – Compétences en transfert de contaminants et écotoxicologie
M. César MATTEI - Maître de conférences des universités - Compétences en toxicologie
M. Alain-Claude ROUDOT - Professeur des universités - Compétences en modélisation mathématique, expologie
M. Yann SIVRY – Maître de conférences des universités – Compétences en chimie analytique
Mme Paule VASSEUR - Professeur des universités, émérite - Compétences en toxicologie

RELECTEURS DU CES ERCA (QUESTIONS 1 A 4)

Mme Martine CLAUW - Professeur des universités - Compétences en toxicologie
Mme Emilie LANCE – Maître de conférences des universités – Compétences en écotoxicologie et cyanotoxines
M. Bruno LE BIZEC - Professeur des universités - Compétences en chimie analytique et en évaluation des risques sanitaires
M. Ludovic LE HEGARAT – Chef d'unité adjoint – Compétences en toxicologie

- Les travaux de la question 5 ont été suivis et adoptés par le CES « Évaluation des risques liés à l'eau » (CES « Eaux »).

Mandat 2020-2023 , dates : 6 avril 2021 ; 1^{er} juin 2021 et 6 juillet 2021

Président

M. Gilles BORNERT – Chef de service – Groupe vétérinaire des armées de Rennes – Microbiologie, réglementation, situations dégradées, water defense.

Vice-présidents

M. Jean-François HUMBERT – Directeur de recherche / Docteur habilité à diriger des recherches – UMR BIOENCO, Institut de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement (INRAE), Paris – Microbiologie de l'eau dont cyanobactéries, écologie microbienne.

Mme Anne TOGOLA – Chef de projet de recherche – Bureau de recherche géologiques et minières (BRGM) – Micropolluants organiques, chimie analytique, eaux souterraines.

Membres

M. Jean BARON – Responsable de département / Ingénieur de recherche – Eau de Paris – Matériaux au contact de l'eau, produits et procédés de traitement de l'eau (filières de traitement), corrosion.

M. Jean-Luc BOUDENNE – Professeur – Université Aix-Marseille – Laboratoire Chimie de l'environnement – Métrologie des eaux, chimie et qualité des eaux.

M. Nicolas CIMETIERE – Enseignant chercheur – École nationale supérieure de chimie de Rennes (ENSCR) – Analyse et traitement des eaux (EDCH, micropolluants organiques).

Bruno COULOMB – Maître de conférences – Université Aix-Marseille – Laboratoire Chimie de l'environnement – Contaminants chimiques, méthodes d'analyse, devenir des contaminants.

M. Christophe DAGOT – Professeur / Directeur de département – Université de Limoges - UMR Inserm 1092, RESINFIT – Antibiorésistance (intégrons, génie des procédés), qualité des effluents (antibiotiques et bactéries résistantes).

Mme Sabine DENOOZ – Expert process et qualité de l'eau – La société wallonne des eaux – Produits et procédés de traitement de l'eau (EDCH), plans de gestion de la sécurité sanitaire des eaux (PGSSE), expertise technique.

Mme Isabelle DUBLINEAU – Chargée de mission auprès du directeur de la radioprotection de l'Homme / Docteur habilité à diriger des recherches – Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire (IRSN) – Toxicologie, radioéléments.

M. Frédéric FEDER – Directeur de l'unité « Recyclage et risque » – Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (CIRAD) – Géochimie, transfert des contaminants eau/sol/plante, évaluation des risques environnementaux, analyses des eaux, sols et végétaux, *reuse*, REUT.

M. Matthieu FOURNIER – Maître de conférences, habilitation à diriger des recherches (HDR) en Géosciences – Université Rouen Normandie – Hydrogéologie, hydrologie, EDCH, transfert et devenir des micro-organismes dans l'environnement, modélisation, risques sanitaires.

M. Stéphane GARNAUD-CORBEL – Chargé de mission recherche « Eau, biodiversité et aménagement urbain » – Office français de la biodiversité (OFB) – Assainissement, gestion intégrée des eaux pluviales, traitement des boues, utilisation d'eaux non conventionnelles.

Mme Nathalie GARREC – Ingénieur recherche expertise – Centre scientifique et technique du bâtiment (CSTB) – Microbiologie de l'eau, pathogènes opportunistes, efficacité des biocides.

M. Johnny GASPÉRI – Chercheur – Université Gustave Eiffel – Micropolluants organiques, eaux urbaines, eaux de surface, traitements des eaux usées.

M. Julio GONÇALVÈS – Professeur – Centre européen de recherche et d'enseignement en géosciences de l'environnement (CEREGE), Aix en Provence – Hydrogéologie, ressources en eaux, transfert de contaminants dans les nappes, modélisation, recharge.

M. Jean-Louis GONZALEZ – Chercheur habilité à diriger des recherches – Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer (IFREMER) – Milieu marin, contaminants chimiques, spéciation, modélisation, échantillonnages passifs.

M. Olivier HORNER – Directeur de la Formation – École nationale supérieure de chimie de Paris (ENSCP), ChimieParisTech – Chimie de l'eau, traitement des eaux.

M. Michel JOYEUX – Retraité, Docteur en Médecine, Docteur en Sciences – Médecine, toxicologie, évaluation quantitative du risque sanitaire, méthodes d'analyse des dangers, chimie de l'eau, produits et procédés de traitement des EDCH, santé environnement.

M. Jérôme LABANOWSKI – Chargé de recherche CNRS – Université de Poitiers - UMR CNRS 7285 IC2MP – École Nationale Supérieure d'Ingénieurs de Poitiers – Qualité des effluents, biofilm en rivière, sédiments, devenir des contaminants effluents-rivière.

Mme Sophie LARDY-FONTAN – Chef de projet en métrologie – LNE, Paris – Métrologie, chimie analytique, micropolluants, ultratrace, assurance qualité/contrôle qualité (QA/QC).

Mme Françoise LUCAS – Enseignant-chercheur – Université Paris-Est Créteil – Virologie, écologie microbienne, indicateurs de contamination fécale, bactériophages, mycobactéries, virus entériques, eaux usées et pluviales.

M. Christophe MECHOUK – Chef de division « Études et construction » – Service de l'eau de la ville de Lausanne – Ingénierie de l'eau (eau potable, eaux usées, eau de process, piscine), traitement de l'eau (procédés), physico-chimie et microbiologie de l'eau, micropolluants.

M. Laurent MOULIN – Responsable du département recherche et développement – Eau de Paris – Microbiologie, virologie, traitements de désinfection, amibes.

M. Damien MOULY – Épidémiologiste, responsable d'unité, en charge de surveillance des épidémies d'origine hydrique – Santé Publique France – Risques infectieux, risques chimiques, PGSSE, épidémiologie, évaluation des risques sanitaires, expologie, surveillance, alerte.

Mme Fabienne PETIT – Enseignant chercheur / Professeur – Université de Rouen / UMR CNRS M2C – Écologie microbienne.

Mme Catherine QUIBLIER – Maître de Conférences Université Paris Diderot, HDR – Museum National d'Histoire Naturelle – Écologie et toxicité des cyanobactéries planctoniques et benthiques, surveillance.

Mme Pauline ROUSSEAU-GUEUTIN – Enseignante chercheuse en hydrogéologie – École des hautes études en santé publique (EHESP) – Hydrogéologie, hydrologie, transferts des contaminants, périmètres de protection de captage, PGSSE.

Mme Marie-Pierre SAUVANT-ROCHAT – Professeur – Université Clermont-Auvergne / Faculté de Pharmacie, Clermont-Ferrand – Santé publique et environnement, épidémiologie, évaluation de risques sanitaires.

Mme Michèle TREMBLAY – Docteur en médecine spécialiste en santé communautaire / Médecin conseil en santé au travail et en maladies infectieuses – Institut de santé publique du Québec / Direction de santé publique de Montréal – Santé travail, microbiologie de l'eau.

PARTICIPATION ANSES

Coordination et contribution scientifique pour les questions 1 à 4

Mme Nathalie ARNICH – Adjointe au chef de l'unité d'Évaluation des risques liés aux aliments – Direction de l'Évaluation des Risques

Mme Estelle CHAIX – Chargée de projets – Unité d'Évaluation des risques liés aux aliments – Direction de l'Évaluation des Risques

Coordination et contribution scientifique pour la question 5

Mme Carole CATASTINI – Chef de projets – Unité d'Évaluation des risques liés à l'eau – Direction de l'Évaluation des Risques

Secrétariat administratif

Mme Angélique LAURENT – Service Appui à l'expertise – Direction de l'Évaluation des Risques

Mme Virginie SADE – Service Appui à l'expertise – Direction de l'Évaluation des Risques

AUDITION DE PERSONNALITÉS EXTÉRIEURES (POUR LES QUESTIONS 1 A 4)

Mme Maud LEMOINE et Mme Nadine NEAUD-MASSON – Ifremer, Nantes – Coordination du REPHY et REPHYTOX, le 25 septembre 2020

SOMMAIRE

1	Contexte, objet et modalités de réalisation de l'expertise.....	16
1.1	Contexte.....	16
1.2	Objet de la saisine.....	16
1.3	Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation.....	16
1.4	Prévention des risques de conflits d'intérêts	17
1.5	Collectes des données.....	17
1.5.1	Revue bibliographique pour les questions 1 à 4	17
1.5.2	Revue bibliographique pour la question 5.....	18
1.5.3	Autres sources de données.....	19
1.6	Voies d'exposition pour l'Homme	20
2	Brevétoxines et autres métabolites potentiellement toxiques de <i>Karenia</i> spp.....	21
2.1	Caractérisation chimique.....	21
2.1.1	Métabolites produits par <i>Karenia</i> spp	21
2.1.2	Métabolisation des brevétoxines par les coquillages	26
2.2	Liste des brevétoxines pour l'expertise	30
2.3	Méthodes analytiques	36
2.3.1	Méthodes physico-chimiques	36
2.3.2	Méthodes biochimiques.....	43
2.3.3	Méthodes biologiques	45
2.3.4	Biocapteurs	46
2.3.5	Bilan des méthodes analytiques	47
2.4	Recommandations du GT pour les méthodes analytiques	50
3	Microalgues productrices de brevétoxines.....	51
3.1	Les dinoflagellés producteurs de brevétoxines et composés assimilés : le genre <i>Karenia</i>	51
3.1.1	<i>Karenia brevis</i>	54
3.1.2	<i>Karenia mikimotoi</i>	57
3.1.3	<i>Karenia papilionacea</i>	59
3.1.4	<i>Karenia brevisulcata</i>	60
3.1.5	<i>Karenia bicuneiformis</i>	62
3.1.6	<i>Karenia selliformis</i>	63
3.1.7	<i>Karenia umbella</i>	64
3.2	Les Raphidophytes	66
3.2.1	<i>Heterosigma akashiwo</i>	67
3.2.2	<i>Chattonella</i>	69
3.2.3	<i>Fibrocapsa japonica</i>	71
3.3	Bilan sur les microalgues productrices de brevétoxines.....	73
3.4	Élimination des efflorescences	74

4	Effets des brevétoxines sur les organismes	75
4.1	Cibles moléculaires et cellulaires	75
4.1.1	Cible moléculaire : le canal sodium sensible au potentiel de membrane	75
4.1.2	Cibles cellulaires	76
4.2	Toxicité <i>in vitro</i>	78
4.2.1	Modification des propriétés biophysiques du canal Na _v par les BTX	78
4.2.2	Effets des BTX au niveau du canal Na _v unitaire neuronal et cardiaque	79
4.2.3	Conséquences de l'augmentation du calcium intracellulaire induite par les BTX	80
4.2.4	Des antagonistes naturels	80
4.2.5	Conclusions	80
4.3	Génotoxicité	81
4.4	Toxicité <i>in vivo</i>	83
4.4.1	Données toxico-cinétiques	83
4.4.2	Toxicité aiguë chez le rongeur	85
4.4.3	Toxicité cardiovasculaire	87
4.4.4	Toxicité par voie respiratoire	88
4.4.5	Conclusions et recommandations	91
4.5	Toxicité chez l'Homme	92
4.5.1	Exposition par ingestion : « Neurotoxic Shellfish Poisoning »	92
4.5.2	Exposition par inhalation	98
4.5.3	Exposition par ingestion d'eau ou contact cutané lors de la baignade	102
4.6	Ecotoxicité	102
4.6.1	Transferts des BTX dans les réseaux trophiques marins	102
4.6.2	Toxicité sur les invertébrés	104
4.6.3	Toxicité sur les poissons	104
4.6.4	Toxicité sur les mammifères, reptiles et oiseaux marins	105
5	Caractérisation du danger	107
6	Contamination du milieu par les brevétoxines	109
6.1	Eau	109
6.2	Aérosols	110
6.3	Eau de pluie et sable	111
6.4	Coquillages	112
6.5	Crustacés	113
6.6	Poissons	113
6.7	Sédiments	115
7	Surveillance	116
7.1	Aux USA	116
7.1.1	Surveillance du phytoplancton dans l'eau	116
7.1.2	Surveillance et contrôle sanitaire	117

7.2	Afrique du sud	121
7.3	Australie et Nouvelle-Zélande	121
7.3	Mexique	123
7.4	France	123
7.4.1	Surveillance des microalgues productrices de brevétoxines et composés assimilés	123
7.4.2	EMERGTOX – réseau de veille d’urgence des biotoxines marines dans les coquillages.....	130
7.5	Autres pays européens	134
7.6	Recommandation du GT pour le suivi des microalgues et des brevétoxines dans les coquillages	135
7.6.1	Recommandations de suivi des microalgues.....	135
7.6.2	Recommandations de valeur guide dans les coquillages	136
7.6.3	Recommandations sur la stratégie analytique dans les coquillages	138
7.6.4	Recommandations de suivi des toxines dissoutes.....	138
7.6.5	Recommandations de surveillance épidémiologique	138
8	Conclusions du groupe de travail	139
9	Besoins de recherche	145
10	Bibliographie	148
	Annexes	154

Sigles et abréviations

AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ARfD	« Acute reference dose », Valeur toxicologique de référence aiguë
BES	Bio-essai souris
BSX	Acides brévisulcatiques
BTX	Brevétoxines
Canal K _v	Canal K ⁺ sensible au potentiel de membrane
Canal Na _v	Canal Na ⁺ sensible au potentiel de membrane
CI ₅₀	Concentration inhibitrice 50%
Chl-a	Chlorophylle a
CT	Chair totale
CTX	Ciguatoxines
Da	Dalton
DGAL	Direction générale de l'alimentation
DGS	Direction générale de la santé
DL ₅₀ , DL ₁₀₀	Dose létale à 50%, Dose létale à 100%
ELISA	Enzyme-linked-immuno-sorbent assay
EMERGTOX	Réseau national de veille d'urgence des biotoxines marines dans les coquillages
FAO	« Food and Agriculture Organization of the United Nations », Organisation pour l'alimentation et l'agriculture
FWC	«The Florida Fish and Wildlife Conservation Commission»
GD	Glande digestive
GT	Groupe de travail
HAEDAT	Harmful Algal Event Database
icv	intracérébroventriculaire
Ifremer	Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer
i.p.	Intrapéritonéal
i.v.	Intraveineux
KBT	Brévisulcénal
LC-HRMS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution
LC-MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse basse résolution
LC-MS/MS	Chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse en tandem
LC-UV	Chromatographie liquide couplée à une détection par spectroscopie UV

LD	Limite de détection
LOAEL	« Lowest Observed Adverse Effect Level », Dose minimale avec effets néfastes
LQ	Limite de quantification
MEB	Microscopie électronique à balayage
MEKC-LIF	Electrophorèse capillaire électrocinétique micellaire couplée à une détection par fluorescence induite par laser
MeOH	Méthanol
MOTE	«MOTE Marine Laboratory & Aquarium» Organisation de recherche marine à but non lucratif
MRM	« Multiple Reaction Monitoring » : mode d'acquisition du signal appliqué en spectrométrie de masse en tandem permettant le suivi de transitions d'ions précurseurs → ions produits pré-programmés (la terminologie SRM est également utilisée)
NOAA	« National Oceanic and Atmospheric Administration »
NOAEL	« No Observable Adverse Effect Level », Dose sans effet néfaste observé
NSP	Neurotoxic shellfish poisoning (intoxication neurologique par les fruits de mer)
NST	Neurotoxic shellfish toxin (toxine neurologique présente dans les fruits de mer)
OBIS	« Ocean biodiversity information system »
PbTx	Brevétoxine selon son ancien nom « <i>Ptychodiscus brevis</i> toxin »
PS-DVB	Polystyrene-divinylbenzene
PVP-DVB	Polyvinylpyrrolidone-divinylbenzene
Q-Orbitrap	Spectromètre de masse hybride quadripôle/orbitrappe
Q-Tof	Spectromètre de masse hybride quadripôle/temps de vol
Q-Trap	Spectromètre de masse hybride quadripôle/piège ionique
REPHY	Réseau d'observation et de surveillance du phytoplancton et de l'hydrologie dans les eaux littorales
REPHYTOX	Réseau de surveillance des phycotoxines dans les organismes marins
RBA	« Receptor binding assay », test de fixation spécifique
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SPE	« Solid Phase Extraction », extraction en phase solide
SPEC	Disques d'extraction en phase solide
SRM	« Selected reaction monitoring » : mode d'acquisition du signal appliqué en spectrométrie de masse en tandem permettant le suivi de transitions d'ions précurseurs → ions produits pré-programmés (la terminologie MRM est également utilisée)
TTX	Tétradotoxines
US	Unité souris
VTR	Valeur toxicologique de référence

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques des métabolites secondaires produits par les espèces de <i>Karenia</i>	22
Tableau 2 : Caractéristiques physico-chimiques des métabolites secondaires rapportés dans les coquillages et autres organismes	29
Tableau 3 : Synthèse des informations identifiées par le GT.....	31
Tableau 4 : Modes d'acquisition du signal appliqués en spectrométrie de masse pour la détection des brevétoxines et de leurs analogues	40
Tableau 5 : Masses des ions précurseurs [M+H] ⁺ des brevétoxines 1 à 9 et de leurs principaux ions produits identifiés par Wu et al. (2014).	41
Tableau 6 : Performances comparées des méthodes LC-HRMS et LC-MS/MS d'analyse des brevétoxines dans les coquillages caractérisées en intra-laboratoire	42
Tableau 7 : Synthèse des performances, des avantages et des inconvénients des méthodes d'analyse mises en œuvre pour l'analyse des brevétoxines	47
Tableau 8 : Toxicité aiguë des BTX chez le rongeur	86
Tableau 9 : Toxicité aiguë des BTX chez les mammifères (signes cardiorespiratoires).....	87
Tableau 10 : Toxicité des brevétoxines par inhalation chez les rongeurs	89
Tableau 11 : Toxicité aiguë des BTX chez les brebis	90
Tableau 12 : Effets de la BTX-3 par voie intratrachéale chez la tortue d'eau douce <i>Trachemys scripta</i>	90
Tableau 13 : Synthèse des symptômes associés à une intoxication alimentaire par les BTX.....	97
Tableau 14 : Doses minimales de BTX associées à des symptômes (« LOAEL aiguës ») et concentrations minimales dans les coquillages associées à des symptômes.....	107
Tableau 15 : Concentrations en brevétoxines dans l'air en fonction de l'intensité de l'efflorescence dans l'eau	110
Tableau 16 : Effets possibles et seuils de classification appliqués aux USA pour <i>K. brevis</i>	120
Tableau 17 : Action de gestion et seuils de déclenchement appliqués dans l'Etat de Victoria, Australie.....	122
Tableau 18 : Effets possibles en fonction des seuils de <i>K. brevis</i> dans l'eau appliqués en Australie et en Nouvelle Zélande	122
Tableau 19 : Détections des taxons potentiellement producteurs de brevétoxines (données REPHY de 1987 à septembre 2020)	127
Tableau 20 : Evaluation du caractère protecteur de la teneur maximale de 20 US/100 g (800 µg BTX-2/kg de chair de coquillages ou 680 µg BTX-3/kg de chair de coquillages)	137

Liste des figures

Figure 1 : Diagramme PRISMA de sélection des articles pour les questions 1 à 4.....	18
Figure 2 : Diagramme PRISMA de sélection des articles pour répondre à la question 5.....	19
Figure 3 : Voies d'exposition de l'Homme aux brevétoxines.....	20
Figure 4 : Structures chimiques de plusieurs métabolites produits par les espèces du genre <i>Karenia</i> 1. Brevétoxine BTX-1, 2. Brevétoxine BTX-2, 3. Hémibrevétoxine, 4. Brévénal, 5. Brévisamide, 6. Brévisine, 7. Tamulamides, 8. Gymnocine-A, 9. Brévisulcénale (KBT-F), 10. Acides Brévisulcatique-1, -4 (BSX-1, BSX-4) et 11. Gymnodimine A.....	21

Figure 5 : Structures chimiques des brevetoxines identifiées dans les échantillons de <i>K. brevis</i> prélevés dans le milieu et les cultures de <i>K. brevis</i>	24
Figure 6 : Brevetoxines (BTX) et analogues identifiées dans <i>K. brevis</i> ou dans des mollusques néo-zélandais toxiques (A) via la métabolisation de la BTX-2.	26
Figure 7 : Structures chimiques des principaux métabolites de BTX-2 identifiés dans les coquillages	28
Figure 8 : Schéma général des méthodes physico-chimiques mises en œuvre pour l'analyse des brevetoxines et de leurs analogues	37
Figure 9 : Classification phylogénétique représentant la diversité des protistes parmi les eucaryotes	51
Figure 10 : Arbre phylogénétique construit à partir d'une région (D1-D2) de la LSU (large sous-unité) ribosomale par la méthode du Maximum Likelihood (ML) représentant l'ensemble du genre <i>Karenia</i> et des espèces associées en particulier a) <i>K. brevis</i> , b) <i>K. mikimotoi</i> , c) <i>K. papilionacea</i> , d) <i>K. brevisulcata</i> , e) <i>K. bicuneiformis</i> ; f) <i>K. selliformis</i> , g) <i>K. umbella</i>	52
Figure 11 : Photos d'efflorescence de <i>Karenia brevis</i>	53
Figure 12 : Occurrence de <i>Karenia</i> spp. (d'après les données du GBIF en novembre 2020, détail en annexe 6)	54
Figure 13 : Cellules de <i>Karenia brevis</i> a) en microscopie photonique et b) en microscopie électronique à balayage (MEB)	55
Figure 14 : Occurrence de <i>Karenia brevis</i> (d'après les données du GBIF en novembre 2020, détail en annexe 6)	56
Figure 15 : Cellules de <i>K. mikimotoi</i> a) photo de Gert Hansen, (http://nordicmicroalgae.org); b) à droite, en microscopie électronique à balayage (MEB)	58
Figure 16 : Occurrence de <i>Karenia mikimotoi</i> (d'après les données du GBIF en novembre 2020, détail en annexe 6)	59
Figure 17 : Cellules de <i>K. papilionacea</i> a) Microphotographies photoniques en vue ventrale cellules fixées au Lugol et b) en microscopie électronique à balayage	59
Figure 18 : Occurrence des <i>Karenia papilionacea</i> (d'après les données du GBIF en novembre 2020, détail en annexe 6)	60
Figure 19 : Cellules de <i>Karenia brevisulcata</i> a) en microscopie photonique et b) en microscopie électronique à balayage	61
Figure 20 : Occurrence de <i>Karenia brevisulcata</i> (d'après les données du GBIF en novembre 2020, détail en annexe 6)	61
Figure 21 : Cellules de <i>Karenia bicuneiformis</i> a) en microscopie photonique et b) en microscopie électronique à balayage	62
Figure 22 : Occurrence de <i>Karenia bicuneiformis</i> (d'après les données du GBIF en novembre 2020, détail en annexe 6)	63
Figure 23 : Cellules de <i>Karenia selliformis</i> a) en microscopie photonique et b) en microscopie électronique à balayage	63
Figure 24 : Occurrence des <i>Karenia selliformis</i> (d'après les données du GBIF en novembre 2020, détail en annexe 6)	64
Figure 25 : Cellules de <i>Karenia umbella</i> a) en microscopie photonique et b) en microscopie électronique à balayage	65
Figure 26 : Occurrence de <i>Karenia umbella</i> (d'après les données du GBIF en novembre 2020, détail en annexe 6)	65
Figure 27 : Arbre phylogénétique (MrBayes) représentant les trois espèces potentiellement toxiques de <i>Raphidophyceae</i> , au sein du groupe des Ochrophyta.	67
Figure 28 : Illustration de <i>H. akashiwo</i>	68

Figure 29 : Occurrence de <i>Heterosigma akashiwo</i> (d'après les données du GBIF en novembre 2020, détail en annexe 6).....	69
Figure 30 : Illustration de <i>Chattonella</i> spp. et photo en microscopie photonique de <i>C. marina</i>	70
Figure 31 : Occurrence de <i>Chattonella</i> (d'après les données du GBIF en novembre 2020, détail en annexe 6).....	71
Figure 32 : Illustration de <i>Fibrocapsa japonica</i>	72
Figure 33 : Occurrence de <i>Fibrocapsa</i> (d'après les données du GBIF en novembre 2020, détail en annexe 6).....	73
Figure 34 : Structure moléculaire du canal Na _v	75
Figure 35 : Les trois états du canal Na _v	76
Figure 36 : Expression tissulaire des canaux Na _v	78
Figure 37 : Effets des BTX sur les propriétés biophysiques des canaux Na _v	79
Figure 38 : Transferts des brevetoxines dans les réseaux trophiques marins	103
Figure 39 : Affiche de prévention (et sa traduction) concernant les symptômes pouvant être associés aux marées rouges en Floride.....	119
Figure 40 : Comparaison morphologique entre <i>K. brevis</i> (à gauche) et <i>K. papilionacea</i> (à droite). <i>K. brevis</i> en microscopie optique.....	124
Figure 41 : Photos de cellules de <i>Kareniaceae</i> , et en particulier de <i>Karenia</i> (cadre rouge), <i>Karlodinium</i> (cadre bleu) et <i>Takaya</i> (cadre vert).....	125
Figure 42 : <i>F. japonica</i> , <i>H. akashiwo</i> , <i>C. marina</i> au microscope optique non fixée	126
Figure 43 : Occurrence des <i>Karenia papilionacea</i> , autres <i>Karenia</i> , <i>Heterosigma</i> , <i>Chattonella</i> et <i>Fibrocapsa japonica</i> (carte de gauche), et des <i>Karenia mikimotoi</i> (carte de droite), recensées sur la période 1987 à août 2020 par le REPHY.....	127
Figure 44 : Evolution des occurrences de <i>K. mikimotoi</i> , <i>Karenia</i> sp., <i>K. papilionacea</i> , <i>H. akashiwo</i> , <i>F. japonica</i> et <i>Chattonella</i> spp. par année de 2000 à 2020.....	128
Figure 45 : Abondances des <i>Karenia papilionacea</i> , autres <i>Karenia</i> (ni <i>mikimotoi</i> , ni <i>papilionacea</i> , ni <i>brevis</i>), <i>Heterosigma</i> , <i>Chattonella</i> et <i>Fibrocapsa japonica</i> , recensées sur la période 1987 à septembre 2020 par le REPHY.....	129
Figure 46 : Carte générale des lieux suivis dans le cadre du réseau EMERGTOX (à la date de novembre 2020).....	131
Figure 47 : Suivi mensuel des BTX (BTX-2 et BTX-3 cumulées) dans les moules de Diana en Corse entre janvier 2018 et novembre 2020.....	132
Figure 48 : Evolution des abondances maximales mensuelles des <i>Heterosigma</i> , <i>Fibrocapsa</i> , <i>Chattonella</i> , <i>Karenia</i> sp et <i>Karenia papilionacea</i> de janvier 2018 à novembre 2020.....	133
Figure 49 : Abondance mensuelles maximales des observations de <i>Karenia</i> spp. de janvier 2018 à décembre 2020 sur l'étang de Diana (Etoile rouge : détection de BTX dans les coquillages via EMERGTOX).....	134
Figure 50 : Différentes voies possibles de formation des aérosols marins le long de l'interface air-mer due à l'interaction entre le vent et les vagues.....	188

1 Contexte, objet et modalités de réalisation de l'expertise

1.1 Contexte

En France, de nombreuses toxines non réglementées sont suivies dans le cadre du réseau de veille d'urgence des biotoxines marines dans les coquillages (EMERGTOX) dont le comité de pilotage est présidé par la DGAL et inclut la DGS, la Direction des pêches maritimes et de l'aquaculture (DPMA), Santé publique France, l'Anses, l'Ifremer et la Direction de l'eau et de la biodiversité (DEB).

Les brevétoxines sont incluses dans ce réseau depuis janvier 2018.

Elles ont été mises en évidence pour la première fois en France en novembre 2018 dans des moules en Corse (117 µg/kg de glande digestive). Le prélèvement d'eau associé pour le suivi du phytoplancton a montré la présence de *Karenia* spp. (genre de microalgues dont certaines espèces produisent des brevétoxines).

Il n'existe pas de limite maximale pour ces toxines dans le règlement (CE) n°853/2004. Les USA, l'Australie/Nouvelle-Zélande et le Mexique appliquent un seuil à 800 µg d'équivalent BTX-2/kg de chair de coquillages. Dans la norme CODEXSTAN 292–2008 (rev.2015) du *Codex alimentarius*, la limite maximale pour les brevétoxines est de 200 unités souris ou équivalent par kg de chair de mollusque vivant.

1.2 Objet de la saisine

Dans ce contexte, il a été demandé à l'Anses de fournir des éléments de réponse aux questions suivantes :

Question 1. Quelles sont les données toxicologiques disponibles pour les brevétoxines ? Permettent-elles à l'Anses de proposer des valeurs toxicologiques de référence aiguë et chronique par voie orale ?

Question 2. Sur la base des données toxicologiques identifiées par l'Anses, est-il possible de proposer une valeur guide dans les coquillages au-delà de laquelle des investigations complémentaires seraient demandées dans le cadre du réseau EMERGTOX ?

Question 3. Quelles modalités de suivi des brevétoxines dans le milieu marin pourraient être recommandées dans le cadre du réseau EMERGTOX ? Quelles investigations complémentaires seraient à réaliser en cas de dépassement de la valeur guide ?

Question 4. Compte tenu des données toxicologiques et au vu du contexte, existe-t-il une préoccupation de santé publique aux niveaux de contamination identifiés dans certaines zones marines françaises liée à la consommation de coquillages ?

Question 5. Existe-t-il une préoccupation sanitaire liée à l'exposition aux brevétoxines par un contact direct avec de l'eau contaminée notamment en cas de baignade ou de pratique d'activités nautiques ou en cas d'exposition par inhalation à des embruns ?

1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

L'expertise des questions 1 à 4 relève du domaine de compétences du Comité d'experts spécialisé « Evaluation des risques physico-chimiques dans les aliments » (CES ERCA). L'Anses a confié l'instruction de cette saisine au groupe de travail « Brevétoxines », constitué par décision du 14 mai 2020 suite à un appel public à candidatures.

Les travaux d'expertise du groupe de travail « Brevétoxines » ont été soumis régulièrement au CES ERCA (tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques) lors des réunions plénières du 5 mars 2020, 7 octobre 2020, 4 novembre 2020, 6 janvier 2021 et 10 février 2021.

Le rapport produit par le groupe de travail tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES et les relecteurs. Les travaux d'expertise ont été adoptés par le CES ERCA le 10 février 2021 à l'unanimité des experts présents.

La question 5 relève du domaine de compétences du CES « Évaluation des risques liés à l'eau » (CES « Eaux »). Cinq rapporteurs ont été nommés le 22 mars 2021 pour répondre à cette question. Les conclusions des rapporteurs ont été présentées au CES « Eaux » lors des réunions plénières des 6 avril 2021, 1^{er} juin 2021 et 6 juillet 2021.

Ces travaux sont ainsi issus de deux collectifs d'experts aux compétences complémentaires.

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – prescriptions générales de compétence pour une expertise (mai 2003) ».

1.4 Prévention des risques de conflits d'intérêts

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet : <https://dpi.sante.gouv.fr/>

1.5 Collectes des données

1.5.1 Revue bibliographique pour les questions 1 à 4

Afin de mener une recherche bibliographique la plus exhaustive possible concernant les articles pertinents pour répondre aux questions de la saisine, une revue systématique (de type « scoping review ») a été réalisée. Deux bases de données (Scopus et Pubmed) ont été interrogées en utilisant le terme « Brevetoxin*» dans le champ « Titre-Résumé-Mot clé » pour Scopus et dans « Tous les champs » pour Pubmed, sans limitation de temps. Les références ont été exportées dans EndNote. La recherche a été réalisée le 14 mai 2020 et a permis d'identifier 868 références (une fois les doublons retirés) qui ont fait l'objet d'une première sélection basée sur les critères d'inclusion et d'exclusion suivants :

Critères d'inclusion :

- Etudes sur les brevétoxines
- Etudes sur l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination des brevétoxines (ADME)
- Toxicité chez l'Homme
- Toxicité *in vivo*
- Toxicité *in vitro*
- Données d'exposition.

Critères d'exclusion :

- Toxine autre que les brevétoxines ou composés assimilés
- Article sur la synthèse chimique de brevétoxines
- Langue autre que français et anglais
- Articles non disponibles en entier.

A l'issue de cette première étape de sélection, 515 références ont été retenues et ont été réparties par thème :

Ecotoxicité : 86
Exposition : 32
Génotoxicité : 5
Méthodes analytiques et chimie : 130
Microalgues productrices de brevétoxines : 44
Surveillance : 5
Toxicité humaine : 28

Toxicité *in vitro* et récepteurs : 121
 Toxicité *in vivo* et articles de revue : 64

Les articles de revues ont été retenus afin de compléter la recherche avec des références qui n'auraient pas été identifiées par l'interrogation des bases de données.

Les experts du groupe de travail ont réalisé la seconde étape de sélection, qui a été validée au cours de la réunion du 15 juillet 2020.

Le détail de la recherche bibliographique figure en Annexe 2. La Figure 1 illustre les différentes étapes.

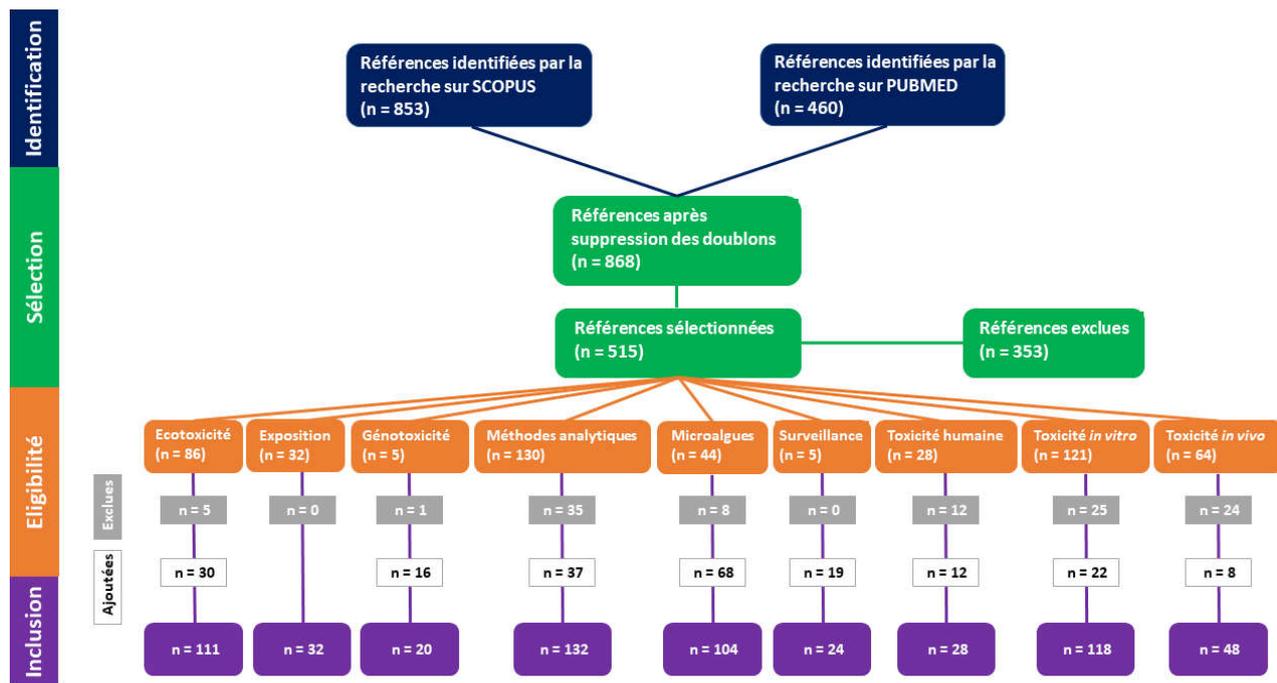


Figure 1 : Diagramme PRISMA de sélection des articles pour les questions 1 à 4

Une mise à jour de la recherche bibliographique a été réalisée en octobre 2020 et a permis d'identifier 4 publications supplémentaires. En décembre 2020, un article mis en ligne a été identifié par un membre du groupe de travail et ajouté au corpus de références.

1.5.2 Revue bibliographique pour la question 5

La recherche a été réalisée en novembre 2020 et complétée en janvier 2021. La base de données Scopus a été interrogée en utilisant dans le champ « Titre-Résumé-Mot clé » sans limitation de temps, le terme « Brevetoxin » associé (AND) avec les termes « aerosol », « monitoring », « lifeguard », « residents » et « swimmer ».

Des documents issus d'autres bases de données (Google Scholar ou dans la littérature grise : 6 documents ont été ajoutés.

Les références ont été exportées dans Endnote. La Figure 2 illustre les différentes étapes de la recherche bibliographique.

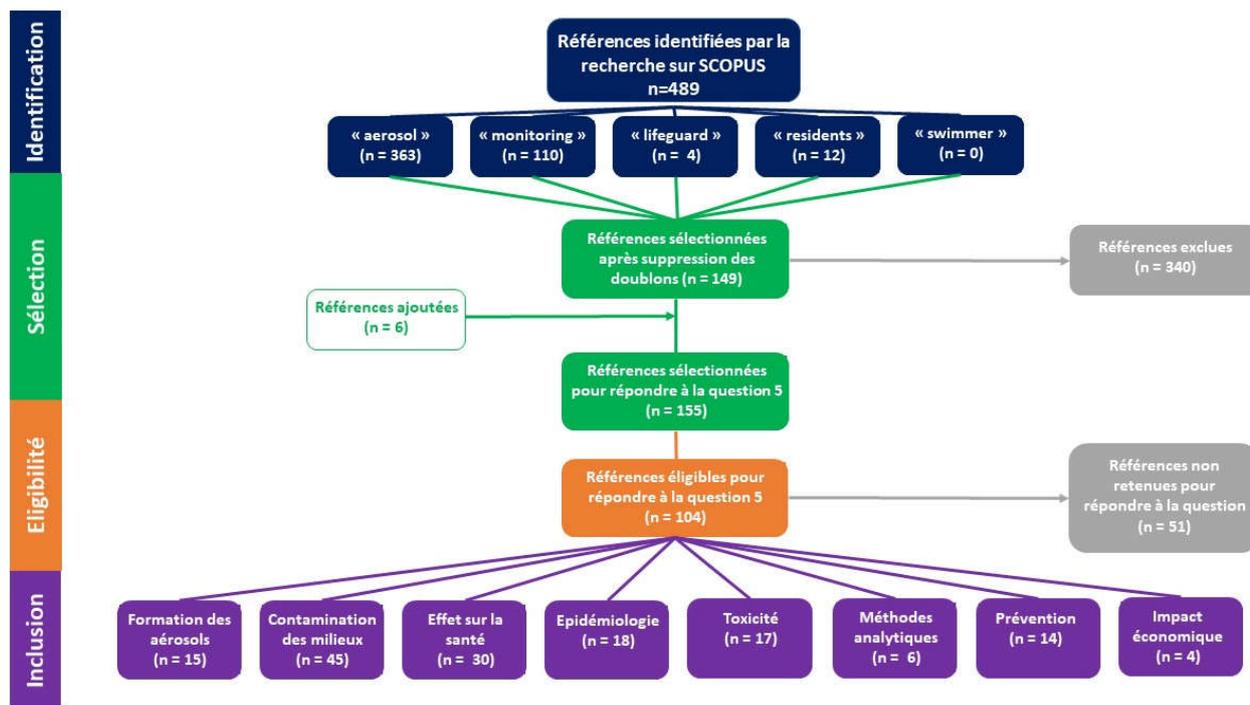


Figure 2 : Diagramme PRISMA de sélection des articles pour répondre à la question 5

1.5.3 Autres sources de données

Le 17 septembre 2020, les Laboratoires Nationaux de Référence (LNR) européens ainsi que le Laboratoire de Référence de l'Union Européenne (LRUE) ont été sollicités par e-mail, afin d'obtenir des informations sur l'existence de données d'occurrence relatives aux brevétoxines non publiées ou de programmes de surveillance des brevétoxines ou de *Karenia spp.* Cette demande a été adressée au 24 pays suivants : l'Allemagne, l'Autriche, la Belgique, Chypre, la Croatie, le Danemark, l'Espagne, la Finlande, la Grèce, la Hongrie, l'Italie, l'Irlande, l'Islande, Malte, la Norvège, les Pays-Bas, la Pologne, le Portugal, la République-tchèque, la Roumanie, le Royaume-Uni, la Slovaquie, la Slovénie et la Suède. Onze de ces pays ont répondu : l'Allemagne, la Belgique, le Danemark, l'Espagne, la Finlande, la Grèce, l'Italie, l'Irlande, les Pays-Bas, le Portugal, le Royaume-Uni.

Le 18 novembre 2020, le réseau ENDWARE² a été sollicité par courrier électronique afin d'obtenir des informations sur des données d'occurrence de *K. brevis*, de brevétoxines ou l'existence de plans de surveillance relatifs à ce dinoflagellé et ses toxines associées dans les eaux récréatives marines. Au 24 février 2021, six pays ont répondu (Allemagne, Danemark, Finlande, Pays-Bas, Portugal, République Tchèque).

² ENDWARE : réseau européen informel en charge de l'élaboration de réglementations sur l'eau destinée à la consommation humaine de pays membres de l'Union européenne « European Network of Drinking Water Regulator »

1.6 Voies d'exposition pour l'Homme

L'Homme peut être exposé aux brevetoxines par voie alimentaire, par inhalation et par contact cutanéomuqueux (Figure 3).

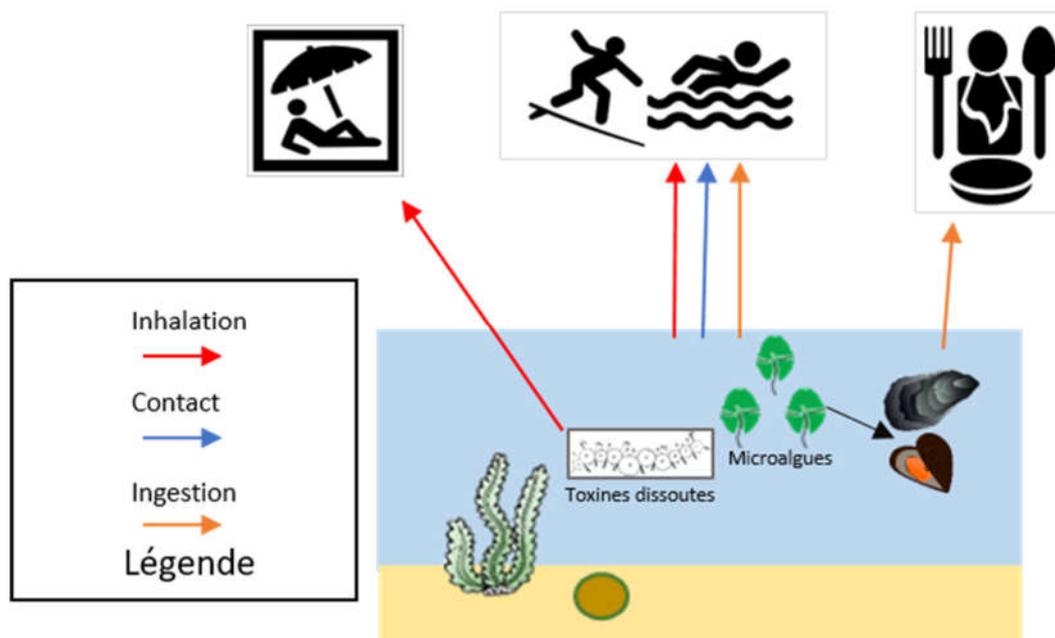


Figure 3 : Voies d'exposition de l'Homme aux brevetoxines

L'inhalation et l'ingestion constituent les deux principales voies d'exposition des brevetoxines pour l'Homme. *K. brevis*, microalgue productrice de brevetoxines, est un dinoflagellé nu, dépourvu de thèque et dont la cellule peut se rompre facilement par turbulence, facilitant ainsi la libération des toxines dans l'eau. Lorsqu'un individu se baigne ou pratique une activité de sports nautiques à proximité d'une efflorescence de *K. brevis*, il peut de façon volontaire ou non, ingérer de l'eau contenant des brevetoxines. L'ingestion d'eau involontaire lors d'une chute dépendra du niveau du pratiquant. Le nageur sans combinaison peut être exposé par contact cutané (Kusek *et al.* 1999; Ramsdell 2008). À ce jour, les effets consécutifs à cette exposition sont peu étudiés. Cette voie d'exposition est considérée comme minoritaire par rapport à la consommation de coquillages. L'exposition aux brevetoxines par inhalation d'aérosols³ se produit chez l'Homme au cours d'activités récréatives, sportives ou professionnelles...

Les microalgues sont consommées par les organismes filtreurs, notamment par les mollusques bivalves, qui ainsi se contaminent après lyse des cellules de *Karenia* dans le tractus digestif. Les consommateurs de coquillages sont ainsi exposés aux toxines algales bioaccumulées dans les tissus ainsi qu'aux composés issus de la biotransformation par les coquillages.

³ La formation des aérosols et plus particulièrement des embruns est décrit à l'annexe 4

2 Brevétoxines et autres métabolites potentiellement toxiques de *Karenia* spp

2.1 Caractérisation chimique

2.1.1 Métabolites produits par *Karenia* spp

Les différentes espèces de *Karenia* produisent une grande diversité de métabolites potentiellement toxiques. *K. brevis* peut produire des brevétoxines, de la brévisine, du brévisamide, des brévénals et des tamulamides. *K. brevisulcata* peut produire les brévisulcénals et les acides brévisulcatiques. *K. mikimotoi* peut produire des gymnocines (Caruana et Amzil 2018). *K. selliformis* peut produire des gymnodimines (Figure 4) (Miles et al. 2003). Le Tableau 1 regroupe les caractéristiques physico-chimiques des métabolites secondaires synthétisés par des dinoflagellés du genre *Karenia*.

Note au lecteur : les différentes appellations des brevétoxines sont reprises dans le Tableau 3.

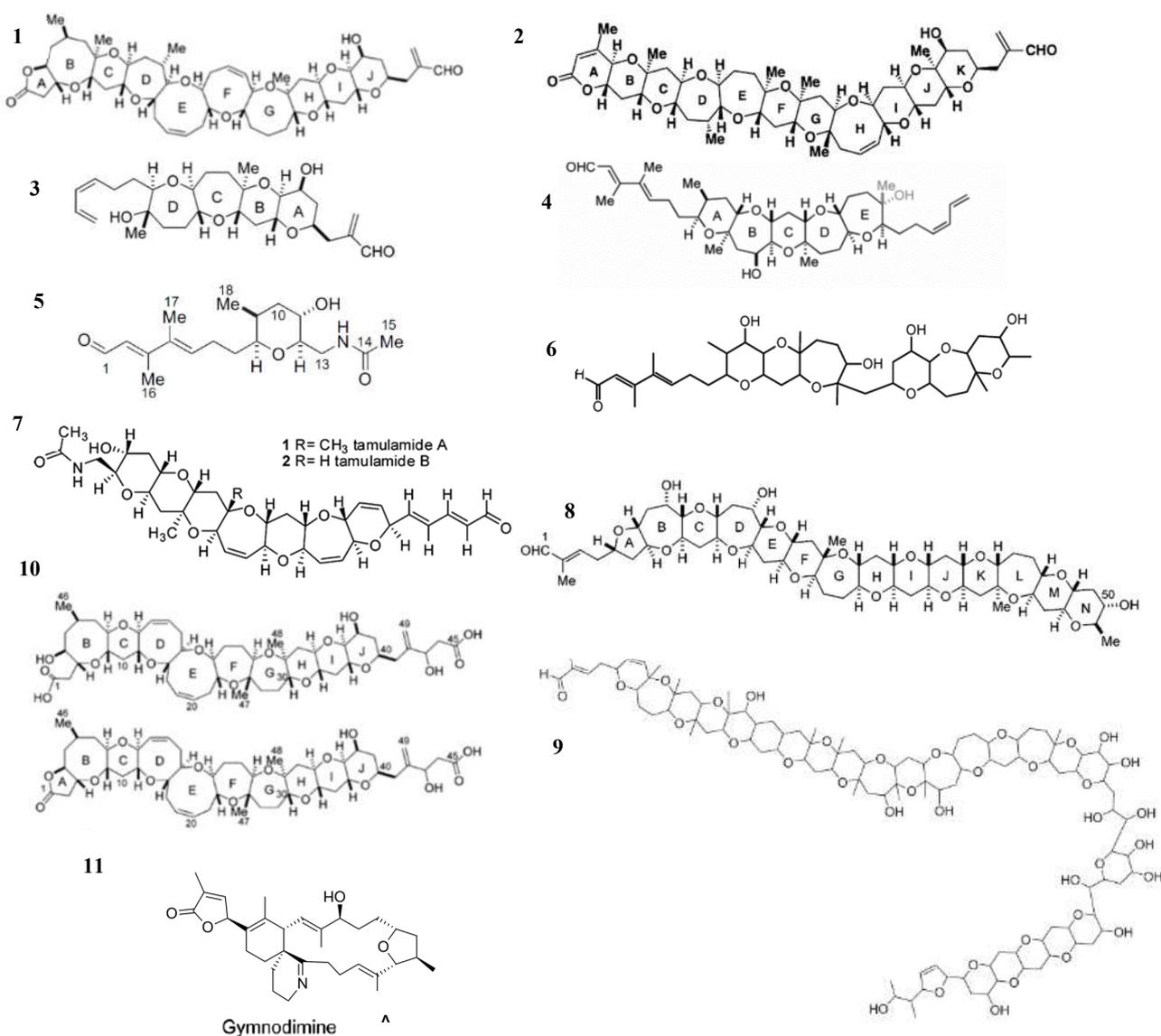


Figure 4 : Structures chimiques de plusieurs métabolites produits par les espèces du genre *Karenia* 1. Brevétoxine BTX-1, 2. Brevétoxine BTX-2, 3. Hémibrevétoxine, 4. Brévénal, 5. Brévisamide, 6. Brévisine, 7. Tamulamides, 8. Gymnocine-A, 9. Brévisulcénale (KBT-F), 10. Acides Brévisulcatique-1, -4 (BSX-1, BSX-4) [d'après Caruana et Amzil (2018)] et 11. Gymnodimine A (d'après Miles et al. (2003)).

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques des métabolites secondaires produits par les espèces de *Karenia* d'après Caruana et Amzil (2018), Golik *et al.* (1982), Blunt *et al.* (2012) et Carreira et Ebner (2016)

Groupe	Métabolite secondaire	Formule brute	Masse moléculaire monoisotopique (Da)	Log P***	Espèce
Brevétoxines de type A (BTX-A)*	BTX-1	C ₄₉ H ₇₀ O ₁₃	866,5	5,8	<i>K. brevis</i>
	BTX-7	C ₄₉ H ₇₂ O ₁₃	868,5	5,7	<i>K. brevis</i>
	BTX-10	C ₄₉ H ₇₄ O ₁₃	870,5	5,5	<i>K. brevis</i>
Brevétoxines de type B (BTX-B)*	BTX-2	C ₅₀ H ₇₀ O ₁₄	894,5	6,4	<i>K. brevis</i>
	BTX-3	C ₅₀ H ₇₂ O ₁₄	896,5	6,4	<i>K. brevis</i>
	BTX-5	C ₅₂ H ₇₄ O ₁₅	938,5	7,1	<i>K. brevis</i>
	BTX-6	C ₅₂ H ₇₂ O ₁₆	952,5	7,3	<i>K. brevis</i>
	BTX-8	C ₄₉ H ₆₉ ClO ₁₄	916,4	6,6	artéfact**
	BTX-9	C ₅₀ H ₇₄ O ₁₄	898,5	6,3	<i>K. brevis</i>
	Hemi-BTX-B	C ₂₈ H ₄₂ O ₇	490,3	/	<i>K. brevis</i>
	BTX-B5	C ₅₀ H ₇₀ O ₁₅	910,5	6,7	<i>K. brevis</i>
Brévenals	Brévenal	C ₃₉ H ₆₀ O ₈	656,4	6,9	<i>K. brevis</i>
	Acétate de Brévenal	C ₄₁ H ₆₆ O ₉	702,5	/	<i>K. brevis</i>
Brévisamide	Brévisamide	C ₁₈ H ₂₉ NO ₄	323,2	/	<i>K. brevis</i>
Tamulamides	Tam -A	C ₃₅ H ₄₅ NO ₁₀	639,3	1,0	<i>K. brevis</i>
	Tam-B	C ₃₄ H ₄₃ NO ₁₀	625,3	0,7	<i>K. brevis</i>
Gymnocines	Gymnocine A	C ₅₅ H ₈₀ O ₁₈	1028,5	3,3	<i>K. mikimotoi</i>
	Gymnocine B	C ₆₂ H ₉₂ O ₂₀	1156,6	5,0	<i>K. mikimotoi</i>
	gymnocin-A carboxylic acid	C ₅₅ H ₈₀ O ₁₉	1044,5	3,6	<i>K. mikimotoi</i>
	Gymnocine A	C ₅₅ H ₈₀ O ₁₈	1028,5	3,6	<i>K. mikimotoi</i>
	Gymnocine A2	C ₅₅ H ₈₀ O ₁₈	1028,5	/	<i>K. mikimotoi</i>
Brévisulcenals	KBT-F	C ₁₀₇ H ₁₆₀ O ₃₈	2053,1	7,9	<i>K. brevisulcata</i>
Acides brévisulcatique	BSX-1	C ₄₉ H ₇₂ O ₁₆	916,5	3,6	
	BSX-4	C ₄₉ H ₇₀ O ₁₅	898,5	3,8	

* classification liée à la structure des molécules, explications dans les paragraphes suivants

** produit considéré comme un artefact généré lors de l'extraction au chloroforme de la BTX-2 à partir de *Karenia brevis* (Baden *et al.* (2005); Abraham *et al.* (2006)).

*** LogP prédits à partir de la structure chimique des molécules en utilisant la plateforme ACD/Labs. Plusieurs algorithmes sont utilisés pour prédire le coefficient de partage octanol/eau.

2.1.1.1 Les brevétoxines

Les brevétoxines (BTX) sont des polyéthers polycycliques liposolubles et thermostables, produits par le dinoflagellé *Karenia brevis* (ancien nom : *Gymnodinium breve* et *Ptychodiscus brevis*). La structure chimique des brevétoxines est très complexe. Il s'agit de polyéthers à membrure en échelle proches des ciguatoxines (CTX). Tous les composés polyéthers de *K. brevis* dériveraient de précurseurs de polyépoxyde (Nakanishi 1985; Van Wagoner *et al.* 2010).

La culture de dinoflagellés producteurs (*K. brevis*) a permis d'obtenir une grande variété de brevétoxines. Leurs structures ont été étudiées essentiellement par cristallographie aux rayons X. Deux squelettes de bases différentes sont connus : les brevétoxines de type A et les brevétoxines de type B (Figure 5). La formule brute de la BTX-1 (type A) est $C_{49}H_{70}O_{13}$, et sa structure est composée de 10 cycles (anneaux) (Chou et Shimizu 1982; Shimizu *et al.* 1986). La formule brute de la BTX-2 est $C_{50}H_{70}O_{14}$, et sa structure est composée de 11 cycles (Lin *et al.* 1981; Poli *et al.* 1986). Les deux structures portent une fonctionnalité lactone qui serait nécessaire à leur activité biologique. La BTX-2 est la principale toxine isolée de *K. brevis* et celle produite par le plus grand nombre d'espèces du genre *Karenia* (Baden *et al.* 2005).

L'élucidation structurale de la BTX-2 a facilité les résolutions ultérieures de toutes les structures chimiques apparentées découvertes par la suite. Chaque famille est constituée de plusieurs composés qui sont différenciés au niveau du cycle J dans les BTX-A (BTX-1, BTX-7, BTX-10) et au niveau du cycle K dans les BTX-B (BTX-2, BTX-3, BTX-5, BTX-6, BTX-8, BTX-9) (Abraham *et al.* 2006) (Figure 5).

D'autres analogues ont été identifiés chez *K. brevis* correspondant aux formes ouvertes du premier anneau (anneau A) de BTX-1, BTX-7, BTX-2 et BTX-3 et les formes oxydées de BTX-1 et BTX-2 (Figure 5) (Abraham *et al.* 2006; Brovedani *et al.* 2016).

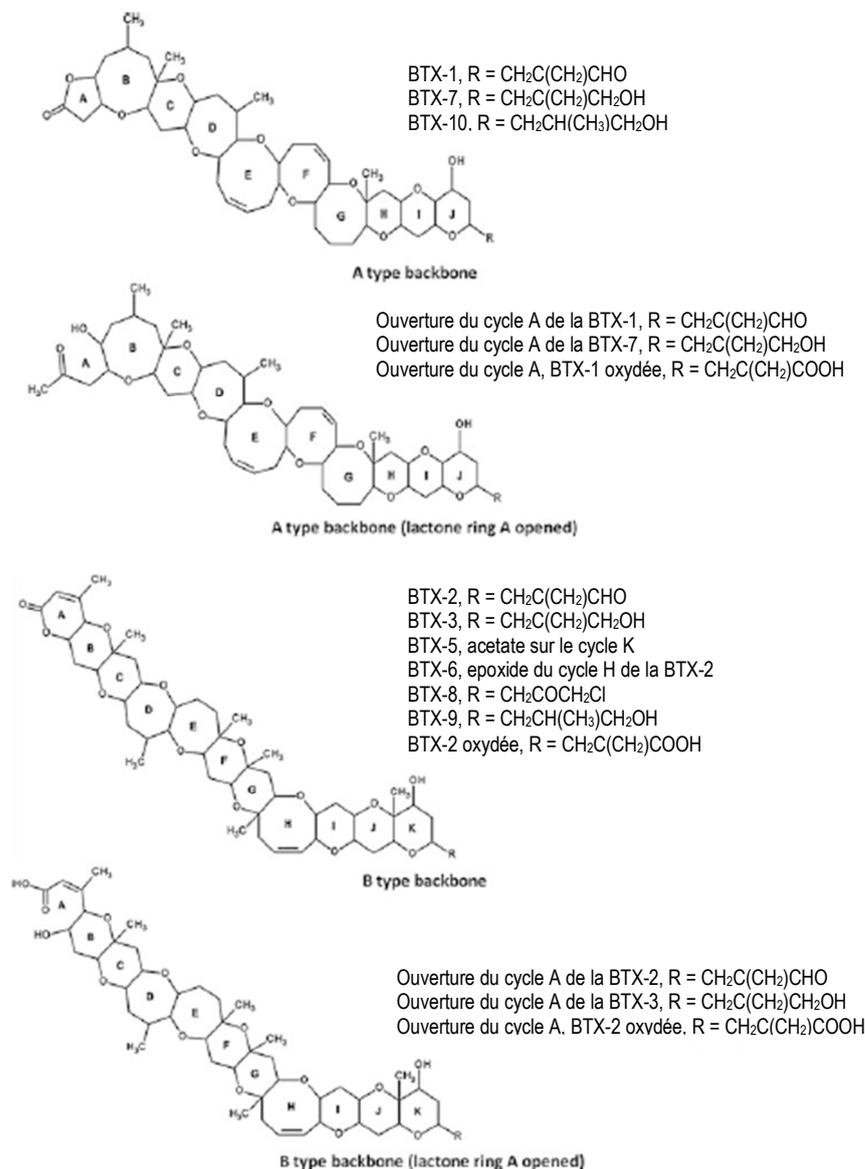


Figure 5 : Structures chimiques des brevétoxines identifiées dans les échantillons de *K. brevis* prélevés dans le milieu et les cultures de *K. brevis* (Brovédani et al. 2016)

2.1.1.2 Hémi-brevétoxines

Les hémi-brevétoxines (Hemi-BTX-A, -B, -C), éthers cycliques, appartiennent à la famille des brevétoxines et sont également synthétisés par *K. brevis*. Seule la structure chimique de l'hémi-BTX-B, dont la formule brute est C₂₈H₄₂O₇, a été élucidée (Shimizu 1982; Prasad et Shimizu 1989) (Figure 4).

2.1.1.3 Brévénals

Le brévénal et l'acétal de brévénal, de formules brutes C₃₉H₆₀O₈ et C₄₁H₆₆O₉ respectivement, ont été extraits de cellules de *K. brevis* (Bourdélais *et al.* 2004; Bourdélais *et al.* 2005; Fuwa *et al.* 2006; Ramsdell 2008). Ce sont des composés liposolubles dont les structures chimiques sont constituées de cinq cycles éther possédant une fonction aldéhyde (Figure 4). L'acétal de brévénal porte un groupement supplémentaire de diméthylacétal.

2.1.1.4 Brévisamide et brévisine

Le brévisamide, de formule brute $C_{18}H_{29}NO_4$, est un éther monocyclique possédant une fonction amide, extrait de *K. brevis* (Satake *et al.* 2008). Il est composé d'un cycle tétrahydropyrane portant une chaîne latérale 3,4-diméthylhepta-2,4 diénal (Figure 4). D'après Lee *et al.* (2015), le brévisamide pourrait être le précurseur de la brévisine.

La brévisine a été identifiée à partir de cellules de *K. brevis*. Sa structure composée d'éthers polycycliques possède une chaîne latérale avec une fonction aldéhyde terminale (Figure 4) (Satake *et al.*, 2009).

2.1.1.5 Brévisulcénales et acides brévisulcatiques

Les brévisulcénales (KBT) et les acides brévisulcatiques (BSX) sont produits par *K. brevisulcata*. Les KBT sont des éthers polycycliques lipophiles possédant une structure chimique en forme d'échelle. Quatre analogues ont à ce jour été identifiés : KBT-F, KBT-G, KBT-H et KBT-I (Holland *et al.* 2012; Harwood *et al.* 2014). Seule la structure chimique du KBT-F a été élucidée avec une formule de $C_{107}H_{160}O_{38}$ (Figure 4) (Hamamoto *et al.* 2012).

Les acides brévisulcatiques (BSX-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7) sont composés de neuf éthers cycliques (Figure 4). La formule brute et la structure chimique des BSX sont proches de celles des brevétoxines de type A, en particulier la disposition en échelle (Suzuki *et al.* 2014). Les BSX-2, BSX-5 et BSX-7 portent une fonction lactone. Différents substituants de la chaîne latérale composent les divers analogues BSX (Irie *et al.* 2016). Seules les formules brutes des BSX-1 ($C_{49}H_{72}O_{16}$) et BSX-2 ($C_{49}H_{70}O_{15}$) ont été déterminées. Harwood *et al.* (2014) suggèrent que le BSX-6 est un intermédiaire dans la biosynthèse des BSX.

2.1.1.6 Tamulamides

Les tamulamides (Tam-A, Tam-B), polyéthers cycliques avec une structure chimique en forme d'échelle, ont été isolés à partir de *K. brevis*. Ils sont composés de sept cycles éthers avec une chaîne latérale possédant une fonction amide et aldéhyde. Tam A et Tam B ont respectivement pour formules brutes $C_{35}H_{45}NO_{10}$ et $C_{34}H_{43}NO_{10}$ (Figure 4) (Truxal *et al.* 2010).

2.1.1.7 Gymnocines

Les gymnocines (Gym) sont des polyéthers synthétisés par *K. mikimotoi*. La structure chimique de la gymnocine-A (Gym-A) a été élucidée la première. Elle est constituée de 14 cycles d'éthers saturés portant une chaîne latérale 2-méthyl-2-buténal (Figure 4) (Satake *et al.* 2002). D'autres analogues ont été identifiés chez *K. mikimotoi* : acide carboxylique-Gym-A, la Gym-A2 (structure similaire à Gym-A), la Gym-B (composé de 15 cycles adjacents se terminant par la même chaîne latérale 2-méthyl-2-buténal (Satake *et al.* 2005; Tanaka *et al.* 2013).

2.1.1.8 Gymnodimines (GYM)

Dans un premier temps, la gymnodimine a été isolée à partir d'extraits d'huîtres néo-zélandaises testées dans le cadre de la surveillance sanitaire des coquillages. Une forte toxicité dans le bio-essai sur souris avec apparition de symptômes neurologiques a été observée, sans qu'aucune intoxication humaine ne soit associée. Les travaux d'isolement de la substance active ont permis d'identifier sa formule brute $C_{32}H_{45}NO_4$ (Seki *et al.* 1995; Miles *et al.* 2003) (Figure 4). L'origine de cette toxine a été attribuée au dinoflagellé *K. selliformis* pour deux raisons : une efflorescence de ce dernier a été observée à la même période ; la gymnodimine a été isolée en culture à partir de cette souche (Medhioub *et al.* 2010). Trois analogues sont connus, les GYM-A, -B, -C (Otero *et al.* 2011).

2.1.2 Métabolisation des brevétoxines par les coquillages

Les brevétoxines produites par *K. brevis* peuvent faire l'objet de métabolisation/bio-transformation dans la glande digestive des coquillages. Depuis la mise en évidence de métabolites de type brevétoxines (détectés par LC-MS et RBA) dans les urines des personnes intoxiquées suite à la consommation de coquillages (bulots, palourdes) contaminés par BTX-3 (Poli *et al.* 2000), la recherche et la caractérisation de ces composés se sont intensifiées à partir des coquillages contaminés naturellement ou expérimentalement. Ces métabolites correspondent à des produits d'oxydation, de réduction, d'hydrolyse ou conjugués d'acides aminés ou d'acides gras des brevétoxines (Plakas et Dickey 2010; Abraham *et al.* 2018) (Figure 6). Ces différents métabolites n'ont pas été trouvés dans les cellules de *K. brevis*, que ce soit en culture au laboratoire ou lors d'efflorescences naturelles.

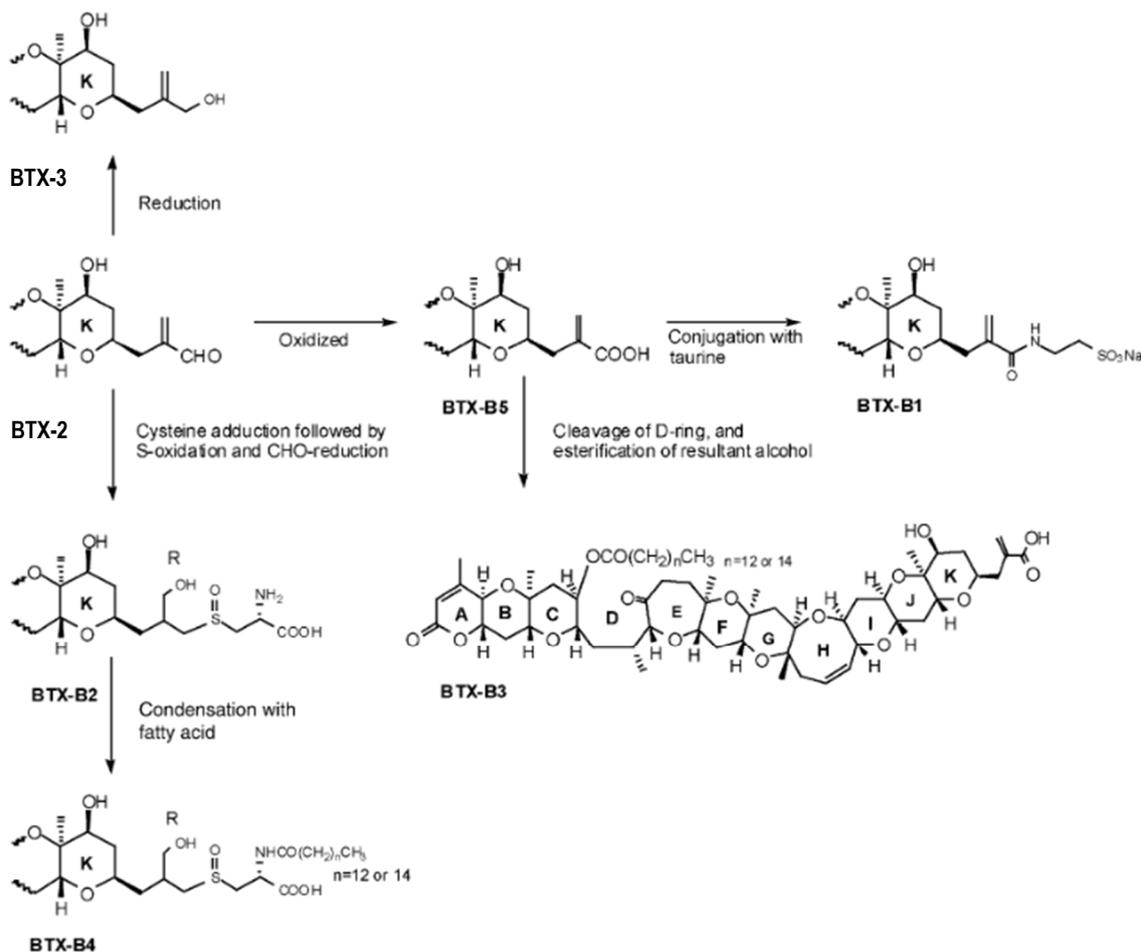


Figure 6 : Brevétoxines (BTX) et analogues identifiées dans *K. brevis* ou dans des mollusques néo-zélandais toxiques (A) via la métabolisation de la BTX-2 (d'après Ishida *et al.* (2004c)).

Les produits de la métabolisation des brevétoxines dans les coquillages présentent une lipophilie différente de leur précurseur. En effet, la fixation d'un acide aminé ou d'un peptide sur la toxine algale concourra à diminuer la lipophilicité, alors que la fixation d'un acide gras l'augmentera. La présence de métabolites plus polaires (Figure 7) que les brevétoxines algales a été démontrée dans les huîtres exposées à une efflorescence de *K. brevis in situ* ainsi que dans des huîtres exposées expérimentalement à *K. brevis*. La BTX-2 accumulée dans les huîtres a été rapidement convertie en plusieurs métabolites plus polaires qui sont ensuite lentement éliminés (Plakas *et al.* 2002; Naar *et al.* 2004; Plakas *et al.* 2004). Cependant, 90% de la BTX-3 mesurée ont été éliminés dans les deux semaines suivant l'exposition, mais sans biotransformation apparente (Plakas *et al.* 2002; Naar *et al.* 2004).

Dans les coquillages, les métabolites de brevétoxines de type B (ex. BTX-2, BTX-3) sont plus abondants que ceux de type A. En effet, des métabolites ont été identifiés dans les coques (*Austrovenus stutchburyi*) (BTX-B1/conjugué taurine-BTX-2) et dans des moules à coquilles vertes (*Perna canaliculus*) (BTX-B2/cystéine sulfoxydée-BTX-2, BTX-B3/conjugué acide gras de la forme ouverte de BTX-2 et BTX-B4/N-palmitoyl-BTX-B2) (Murata *et al.* 1998; Morohashi *et al.* 1999) (Ishida *et al.* 2004c; Abraham *et al.* 2006; Bottein *et al.* 2010; Abraham *et al.* 2015; Abraham *et al.* 2018). Après exposition à une culture de *K. brevis*, la coque (*A. stutchburyi*) et la moule verte (*P. canaliculus*) absorbent et métabolisent rapidement la BTX-2. Chez *A. stutchburyi*, la majeure partie de la BTX-2 est métabolisée en BTX-3, BTX-B5 et BTX-B1, alors que chez *P. canaliculus* environ la moitié de la BTX-2 est métabolisée en BTX-3 et BTX-B5 (Ishida *et al.* 2004b). Plakas *et al.* (2008) ont observé que les adduits Cystéine et S-désoxy de BTX-B2 et la BTX-B2 étaient les métabolites les plus abondants et les plus persistants parmi ceux examinés chez *Crassostrea virginica*. Six mois après exposition expérimentale à *K. brevis*, ces métabolites étaient toujours détectables dans les tissus des huîtres.

La présence de BTX-B2, BTX-B3 et BTX-B4 dans *P. canaliculus* suggère que les voies métaboliques de cette espèce sont plus complexes que celles des coques (*A. stutchburyi*) pour lesquelles un seul métabolite a été identifié (BTX-B1). Aussi, les concentrations des brevétoxines et de leurs métabolites varient considérablement entre les espèces de mollusques de bivalves contaminées : BTX-2, BTX-3 et BTX-B5 dans l'huître (*C. gigas*), BTX-3, BTX-B1 et BTX-B5 dans la coque (*A. stutchburyi*), et BTX-2, BTX-3 et BTX-B5 dans la moule à coquille verte (*P. canaliculus*) (Morohashi *et al.* 1995; Ishida *et al.* 1996; Murata *et al.* 1998; Morohashi *et al.* 1999; Nozawa *et al.* 2003; Ishida *et al.* 2004b).

La cinétique d'élimination individuelle des métabolites par les coquillages varie et, par conséquent, la toxicité de ces derniers fluctue dans le temps en fonction du profil toxinique (Plakas *et al.* 2008).

La Figure 7 regroupe les principaux métabolites de brevétoxines formés dans la glande digestive des coquillages à partir de la toxine algale BTX-2.

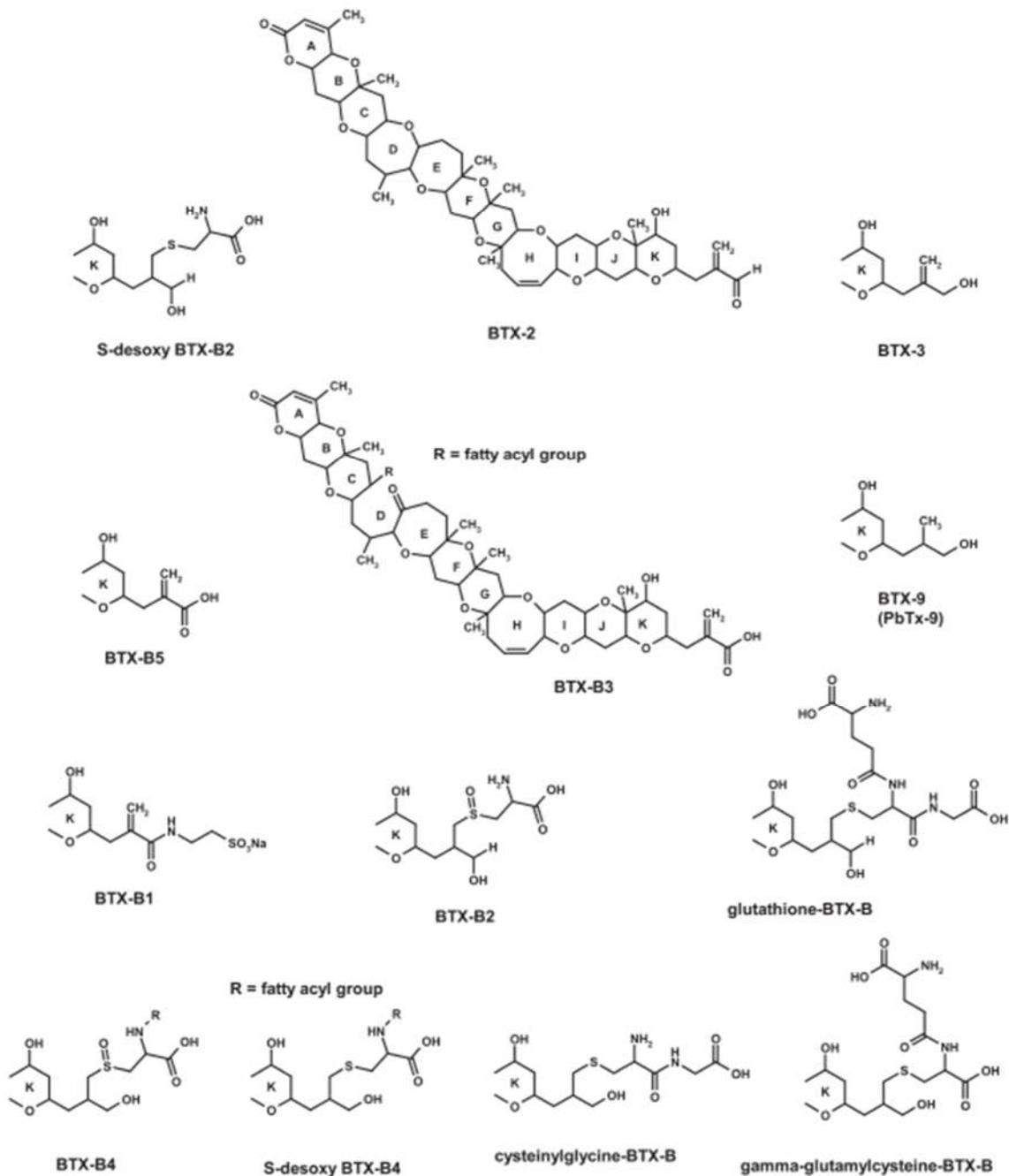


Figure 7 : Structures chimiques des principaux métabolites de BTX-2 identifiés dans les coquillages (Abraham *et al.* 2018).

Le tableau 2 regroupe les caractéristiques physico-chimiques des métabolites rapportés dans les coquillages.

Tableau 2 : Caractéristiques physico-chimiques des métabolites secondaires rapportés dans les coquillages et autres organismes (d'après Ishida *et al.* (2004b); Selwood *et al.* (2008); Abraham *et al.* (2018))

Métabolite secondaire	Formule brute	Masse moléculaire monoisotopique (Da)	LogP *	Matrice
Glutathione BTX-A	C ₅₉ H ₈₉ N ₃ O ₁₉ S	1175,6	/	coquillages
Glycine cysteine BTX-A	C ₅₄ H ₈₂ N ₂ O ₁₆ S	1046,5	/	coquillages
BTX-2	C ₅₀ H ₇₀ O ₁₄	894,5	6,4	se transforme rapidement dans le coquillage en BTX-3 et autres métabolites
BTX-3	C ₅₀ H ₇₂ O ₁₄	896,5	6,4	coquillages, poissons
BTX-B1 (taurine-BTX-B)	C ₅₂ H ₇₄ NNaO ₁₇ S	1039,5	/	coquillages
BTX-B2 (cystéine-BTX-B sulfoxyde)	C ₅₃ H ₇₉ NO ₁₇ S	1033,5	4,3	coquillages, crustacés
S-désoxy-BTX-B2 (cystéine-BTX-B)	C ₅₃ H ₇₉ NO ₁₆ S	1017,5	/	coquillages
BTX-B3	C ₆₄ H ₉₆ O ₁₇	1136,7	/	coquillages
BTX-B4a (N-tetradecanoyl-cysteine-BTX-B sulfoxyde; N-Myristoyl BTX-B2)	C ₆₇ H ₁₀₅ NO ₁₈ S	1243,7	11,3	coquillages
BTX-B4b (N-hexadecanoyl-cystéine-BTX-B sulfoxyde; N-palmitoyl BTX-B2)	C ₆₉ H ₁₀₉ NO ₁₈ S	1271,7	12,32	coquillages
BTX-B5	C ₅₀ H ₇₀ O ₁₅	910,5	6,7	coquillages
14:0 N-acyl-brevetoxin B2	C ₆₇ H ₁₀₅ NO ₁₈ S	1243,7	/	coquillages
16:0 N-acyl-S-desoxybrevetoxin B2	C ₆₉ H ₁₀₉ NO ₁₇ S	1255,7	/	coquillages
18:0 N-acyl-S-desoxybrevetoxin B2	C ₇₁ H ₁₁₃ NO ₁₇ S	1283,8	/	coquillages
18:1 N-acyl-S-desoxybrevetoxin B2	C ₇₁ H ₁₁₁ NO ₁₇ S	1281,8	/	coquillages
20:1 N-acyl-S-desoxybrevetoxin B2	C ₇₃ H ₁₁₅ NO ₁₇ S	1309,8	/	coquillages
20:0 N-hydroxyacyl-S-desoxybrevetoxin B2	C ₇₃ H ₁₁₇ NO ₁₈ S	1327,8	/	coquillages
Glycine-14:0 N-acyl-cysteine brevetoxin B	C ₆₉ H ₁₀₈ N ₂ O ₁₈ S	1284,7	/	coquillages
Glycine-16:0 N-acyl-cysteine brevetoxin B	C ₇₁ H ₁₁₂ N ₂ O ₁₈ S	1312,8	/	coquillages

Métabolite secondaire	Formule brute	Masse moléculaire monoisotopique (Da)	LogP *	Matrice
Glutathione brevetoxin B	C ₆₀ H ₈₉ N ₃ O ₂₀ S	1203,6	/	coquillages
Glycine cysteine brevetoxin B	C ₅₅ H ₈₂ N ₂ O ₁₇ S	1074,5	/	coquillages
γ-glutamyl cysteine brevetoxin B	C ₅₈ H ₈₆ N ₂ O ₁₉ S	1146,6	/	coquillages
27,28-diol brevetoxin 2	C ₅₀ H ₇₆ O ₁₆	928,5	/	coquillages
1,5-deepoxy-1,4,2-dideoxo-1,5,4,2-trihydroxy brevetoxin 2	C ₅₀ H ₇₆ O ₁₄	900,5	/	coquillages
1-carboxy-5-hydroxy brevetoxin 3	C ₅₁ H ₇₄ O ₁₆	942,5	/	coquillages
27,28-diol brevetoxin 3	C ₅₀ H ₇₄ O ₁₆	930,5	/	coquillages
27,28-epoxy brevetoxin 3	C ₅₀ H ₇₂ O ₁₅	912,5	/	coquillages
α-naphthoyl brevetoxin 3	C ₆₁ H ₇₈ O ₁₅	1050,5	/	coquillages
1-deoxy brevetoxin 3	C ₅₀ H ₇₄ O ₁₃	882,5	/	coquillages
1-carboxy-5-hydroxy brevetoxin 9	C ₅₁ H ₇₆ O ₁₆	944,5	/	coquillages

* LogP prédits à partir de la structure chimique des molécules en utilisant la plateforme ACD/Labs. Plusieurs algorithmes sont utilisés pour prédire le coefficient de partage octanol/eau.

La grande diversité des caractéristiques physico-chimiques des métabolites de brevétoxines complexifie le développement de méthodes analytiques multi-toxines performantes. De plus, l'absence d'étalons pour la majorité de ces métabolites rend difficile la détermination du profil toxique complet des coquillages. L'extraction de ces métabolites possédant des propriétés chimiques diverses avec des polarités très variables, constitue une difficulté supplémentaire. C'est pourquoi, différents auteurs soulignent la pertinence des métabolites BTX-3 et BTX-B5 qui sont relativement persistants dans les coquillages, et qui pourraient être des biomarqueurs d'exposition pertinents afin de surveiller la toxicité des mollusques suite à une efflorescence de *K. brevis*.

Pour beaucoup de ces composés la structure chimique reste à élucider. En effet, l'identification de ces métabolites a été réalisée sur la base de tests biochimiques ou biologiques, pour leur détection et sur la LC-MS/MS et/ou LC/HRMS. Cette dernière technique peut permettre de déterminer la masse moléculaire et la formule brute. L'élucidation structurale de ces composés passera par leur purification et leur isolement à partir d'une biomasse en quantité importante en vue de disposer d'une quantité notable de composé pure permettant de compléter les investigations par RMN (résonance magnétique nucléaire). La disponibilité des métabolites à l'état pur permettra de disposer de matériaux de référence, ce qui autorisera la validation des méthodes analytiques dans différentes matrices (microalgues, coquillages, poissons...). La disponibilité de ces substances de référence permettra enfin de caractériser leurs propriétés toxicologiques.

2.2 Liste des brevétoxines pour l'expertise

Le tableau 3 présente une synthèse des informations recueillies et analysées par le GT concernant les divers métabolites secondaires produits par *Karenia sp.*, issus du métabolisme par les coquillages et leur potentiel toxique (informations détaillées pour les composés majeurs dans le chapitre 4).

Tableau 3 : Synthèse des informations identifiées par le GT

Groupe	Métabolite secondaire Appellation retenue par le GT	Synonyme	Etalon disponible	Matrice	Potentiel toxique
Brévéttoxine A / BTX-A	BTX-1	PbTx-1, GB1, T46, BTX-A	oui	<i>K. brevis</i>	RBA + N2a + Cytotoxicité +>BTX3 Toxicité in vivo +
	Cysteine-BTX-1	/	non	coquillages	NR
	Cysteine-BTX-1-Sulfoxyde	/	non	coquillages , potentiel artéfact	NR
	BTX-7 / PbTx-7	/	non	<i>K. brevis</i>	N2a +
	BTX-10 / PbTx-10	/	non	<i>K. brevis</i>	NR
	16:0 N-acyl-cysteine brevetoxin A	/	non	coquillages	NR
	Glutathione brevetoxin A	/	non	coquillages	NR
	Glycine cysteine brevetoxin A	/	non	coquillages	NR
	Forme ouverte de l'anneau A de BTX-1	/	non	<i>K. brevis</i>	NR
	Forme oxydée de BTX-1	/	non	<i>K. brevis</i>	NR
	Forme ouverte de l'anneau A de BTX-7	/	non	<i>K. brevis</i>	NR
Brévéttoxine B / BTX-B	BTX-2	PbTx-2, T47, GB2, T34, BTX-B	oui	<i>K. brevis</i> , se transforme rapidement dans le coquillage en BTX-3 et autres métabolites	génétox ? (<i>vitro et vivo</i>) RBA + N2a + Cytotox + Tox in vivo +
	BTX-3	PbTx-3, GB3, T17, dihydro-BTX-B	oui	<i>K. brevis</i> , coquillages (rémanance), poissons	génétox ? (<i>vitro</i>) RBA + N2a + HEK + Tox in vivo ++ Test ELISA exprimé en BTX-3 La plus étudiée en toxicité
	BTX-5	PbTx-5	non	<i>K. brevis</i> , coquillages , urine humaine	NR
	BTX-6	PbTx-6	non	<i>K. brevis</i>	génétox ? (<i>vitro + et vivo -</i>) liaison AhR
	BTX-9	PbTx-9	oui	<i>K. brevis</i>	génétox ? (<i>vitro</i>) RBA +

Groupe	Métabolite secondaire Appellation retenue par le GT	Synonyme	Etalon disponible	Matrice	Potentiel toxique
	BTX-11 (?)	PbTx-11	non		RBA +
	BTX-12 (?)	PbTx-12	non		RBA +
	BTX-B1	Taurine BTX-B	non	coquillages (rémanante)	Tox <i>in vivo</i> ++
	BTX-B2	Cystéine BTX-B sulfoxyde	non	coquillages (forte abondance et rémanance), crustacés	RBA + N2a + HEK + Tox <i>in vivo</i> +
	S-désoxy-BTX-B2	Cystéine BTX-B	non	coquillages	RBA + N2a + HEK +
	BTX-B3	Mélange de tétradecanoyl et d'hexadecanoyl-BTX-2 avec cycle-D ouvert (oxidé)	non	coquillages	Tox <i>in vivo</i> +
	BTX-B4a	N-tétradecanoyl- cystéine-BTX-B sulfoxyde, myristoyl- BTX-B2	non	coquillages	en mélange avec la BTX-B4b N2a+, Tox <i>in vivo</i> ++
	BTX-B4b	N-hexadecanoyl- cystéine-BTX-B sulfoxyde, N- palmitoyl-BTX-B2	non	coquillages	RBA + N2a + Tox <i>in vivo</i> ++ en mélange avec la BTX-B4a
	BTX-B5	acide 42-carboxylique de la brevetoxin 3	oui	<i>K. brevis</i> , coquillages	NR
	N-tétradecanoyl-cystéine- PbTx-B	/	non	coquillages	NR
	N-hexadecanoyl-cystéine- PbTx-B	/	non	coquillages	NR
	N-octadecanoyl-cystéine- PbTx-B	/	non	coquillages	NR
	N-eicosenoyl-cystéine- PbTx-B	/	non	coquillages	NR
	N-tétradecanoyl-cystéine- PbTx-B-Sulfoxyde	/	non	coquillages	NR
	N-hexadecanoyl-cystéine- PbTx-B-Sulfoxyde	/	non	coquillages	NR
	N-(hydroxy-eicosenoyl)- cystéine-PbTx-B	/	non	coquillages	NR
	14:0 N-acyl-brevetoxin B2	/	non	coquillages	NR

Groupe	Métabolite secondaire Appellation retenue par le GT	Synonyme	Etalon disponible	Matrice	Potentiel toxique
	14:0 N-acyl-S- desoxybrevetoxin B2	/	non	coquillages	NR
	16:0 N-acyl-S- desoxybrevetoxin B2	/	non	coquillages	NR
	18:0 N-acyl-S- desoxybrevetoxin B2	/	non	coquillages	NR
	18:1 N-acyl-S- desoxybrevetoxin B2	/	non	coquillages	NR
	20:1 N-acyl-S- desoxybrevetoxin B2	/	non	coquillages	NR
	20:0 N-hydroxyacyl-S- desoxybrevetoxin B2	/	non	coquillages	NR
	Glycine-14:0 N-acyl- cysteine brevetoxin B	/	non	coquillages	NR
	Glycine-16:0 N-acyl- cysteine brevetoxin B	/	non	coquillages	NR
	Glutathione brevetoxin B	/	non	coquillages	NR
	Glycine cysteine brevetoxin B	/	non	coquillages	NR
	Y-glutamyl cysteine brevetoxin B	/	non	coquillages	NR
	27,28-diol brevetoxin 2	/	non	coquillages	NR
	1,5-deepoxy-1,42-dideoxo- 1,5,42-trihydroxy brevetoxin 2	/	non	coquillages	NR
	42-deoxo-2,3,41,43- tetrahydro-42-hydroxy brevetoxin 2	/	non	coquillages	NR
	1-carboxy-5-hydroxy brevetoxin 3	/	non	coquillages	NR
	27,28-diol brevetoxin 3	/	non	coquillages	NR
	27,28-epoxy brevetoxin 3	/	non	coquillages	NR
	α-naphthoyl brevetoxin 3	/	non	coquillages	NR
	1-deoxy brevetoxin 3	/	non	coquillages	NR
	1-carboxy-5-hydroxy brevetoxin 9	/	non	coquillages	NR
	oxidized BTX-B5	/	non	coquillages	NR
	N-hexadecanoyl-S-deoxy BTX-B2	/	non	coquillages	NR
	N-hexadecanoyl- BTX-B2	/	non	coquillages	NR

Groupe	Métabolite secondaire Appellation retenue par le GT	Synonyme	Etalon disponible	Matrice	Potentiel toxique
	N-octadecanoyl-S-deoxy- BTX-B2	/	non	coquillages	NR
	N-(hydroxy-eicosanoyl)-S- deoxy-BTX-B2	/	non	coquillages	NR
	N-(hydroxy-eicosanoyl)- BTX-B2	/	non	coquillages	NR
	N-(hydroxy- hexadecenoyl)-S-deoxy- BTX-B2	/	non	coquillages	NR
	N-(hydroxy- hexadecenoyl)--BTX-B2	/	non	coquillages	NR
	N-octadecenoyl-BTX-B2	/	non	coquillages	NR
	N-octadecanoyl-BTX-B2	/	non	coquillages	NR
	N-didécenoyl-BTX-B2	/	non	coquillages	NR
	N-arachidonyl-BTX-B2	/	non	coquillages	NR
	Forme ouverte de l'anneau A de BTX-2	/	non	<i>K. brevis</i>	RBA +/-
	Forme ouverte de l'anneau A de BTX-3	/	non	<i>K. brevis</i>	RBA +/-
	Forme oxydée de BTX-2	/	non	<i>K. brevis</i>	NR
Hémi- Brevétoxine Hémi-BTX	Hémi-BTX-A/GB-M	/	non	<i>K. brevis</i>	NR
	Hémi-BTX-B/GB-N	/	non	<i>K. brevis</i>	NR
	Hémi-BTX-C/GB-4	/	non	<i>K. brevis</i>	NR
Brévenals	Brévenal	/	non	<i>K. brevis</i>	Effets antagonistes des BTX <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> (inhalation)
	Acétate de Brévenal	/	non	<i>K. brevis</i>	NR
Brévisamide	Brévisamide	/	non	<i>K. brevis</i>	NR
Brévicine	Brévicine	/	non	<i>K. brevis</i>	NR
Tamulamides (Tam)	Tam -A	/	non	<i>K. brevis</i>	NR
	Tam-B	/	non	<i>K. brevis</i>	NR
Gymnocines	Gymnocin-A Gymnocin-A2 Gymnocin-A carboxylic acid Gymnocin-B Gymnocin-C	/	non	<i>K. mikimotoi</i>	Tox <i>in vitro</i>
Brévisulcenals (KBT)	KBT-F	/	non		N2a + Tox <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> ++

Groupe	Métabolite secondaire Appellation retenue par le GT	Synonyme	Etalon disponible	Matrice	Potentiel toxique
	KBT-G	/	non	<i>K. brevisulcata</i> , BSX dans des coquillages (BSX-5 plus abondant)	N2a + Tox <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> ++
	KBT-H	/	non		Tox <i>in vitro</i>
	KBT-I	/	non		Tox <i>in vitro</i>
Acides brévisulcatique (BSX)	BSX-1	/	non		N2a +/- Tox <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> +
	BSX-2	/	non		N2a +/- Tox <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> +/-
	BSX-3	/	non		NR
	BSX-4	/	non		N2a + Tox <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> +
	BSX-5	/	non		N2a + Tox <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> +
	BSX-6	/	non		NR
	BSX-7	/	non		NR
Gymnodimines (GYM)	GYM-A	/	non	<i>K. selliformis</i>	Hors champ de cette saisine
	GYM-B	/	non		
	GYM-C	/	non		
	GYM-D	/	non		
	GYM-E	/	non		
BTX-8	BTX-8	/	non	Artefacts issus des processus d'extraction / purification	NR
BTX-13	BTX-8	/	non		NR
BTX-14	BTX-14	/	non		NR

NR : non renseigné. Le GT n'a pas identifié d'information dans la littérature ; N2a + : toxicité observée dans les cellules de neuroblastome Neuro-2a ; RBA + : résultat positif par RBA ; Tox *in vitro* + : toxicité observée dans des essais *in vitro* ; Tox *in vivo* + : toxicité observée dans des essais *in vivo* (++ : très forte toxicité) ; génotox ? : métabolite testé pour la génotoxicité mais résultat non conclusif (voir chapitre 4.3)

En prenant en compte le potentiel toxique, l'occurrence des toxines dans les coquillages et la disponibilité des étalons, les brevétoxines retenues par le GT sont les suivantes : BTX-1, BTX-2, BTX-3, BTX-B1, BTX-B2, S-désoxy-BTX-B2, BTX-B3, BTX-B4(a et b) (cellules colorées en orange dans le tableau 3).

Certains métabolites de brevétoxines présents dans les coquillages (et autres organismes marins) n'ont pas été retenus car leur structure chimique et leur potentiel toxique n'est pas renseigné.

Les métabolites grisés dans le tableau 3 ne sont pas retenus car ils sont hors champs de la saisine (ils ne sont pas assimilés aux brevétoxines).

Les informations utilisées pour renseigner la colonne « Potentiel toxique » sont détaillées dans le chapitre 4 « Effets des brevétoxines sur les organismes ».

2.3 Méthodes analytiques

Trois grands types de méthodes peuvent être mises en œuvre pour l'analyse des brevétoxines dans des cellules microalgales, des prélèvements d'eaux lors d'efflorescences, des organismes marins (mollusques, poissons) et des prélèvements d'embruns/d'aérosols :

- les méthodes physico-chimiques (telles que les méthodes par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse, LC-MS) ;
- les méthodes biochimiques (e.g. ELISA, RIA, RBA) ;
- les méthodes biologiques (tests *in vivo* et *in vitro*).

Plusieurs de ces méthodes ont été validées en intra- et inter-laboratoires. Toutefois, aucune n'a fait l'objet d'une validation inter-laboratoires suivant les lignes directrices de référentiels tels que l'ISO 5725 ou l'annexe D de l'AOAC (Dickey *et al.* 2004; EFSA 2010; Turner *et al.* 2015). Ainsi, à ce jour, aucune méthode permettant la recherche des brevétoxines n'est normalisée. Il n'existe pas, non plus, de critères de performances minimales requises pour ces méthodes d'analyse. Contrairement à certains groupes de toxines de microalgues, il n'existe pas de circuit inter-laboratoires permettant de vérifier l'aptitude et la compétence des laboratoires d'analyses.

2.3.1 Méthodes physico-chimiques

Les méthodes physico-chimiques existantes permettent de rechercher les brevétoxines et leurs analogues dans des extraits de cultures de *Karenia spp.*, dans des prélèvements d'eaux lors d'efflorescences algales, dans des organismes marins (poissons, mollusques, crustacés) ou encore dans des prélèvements d'embruns. En fonction du type de matrice, les méthodes analytiques décrites dans la littérature diffèrent, et notamment le protocole d'extraction/purification.

Plusieurs techniques permettent de séparer et détecter les brevétoxines et leurs analogues. Parmi elles, figure la chromatographie liquide couplée à la spectroscopie UV ou l'électrophorèse capillaire électrocinétique micellaire (MEKC) couplée à la fluorescence induite par laser (LIF) (Baden et Tomas 1988; Pierce *et al.* 1992; Hua *et al.* 1995; Hua *et al.* 1996; Shea 1997; Brousseau *et al.* 1998; Holland *et al.* 2012). Toutefois, dans la très grande majorité des travaux, la LC-MS est employée (simple ou triple quadripôle(s)).

La Figure 8 présente le schéma général de l'analyse des brevétoxines et de leurs analogues, tels que décrits dans les différents protocoles développés à ce jour.

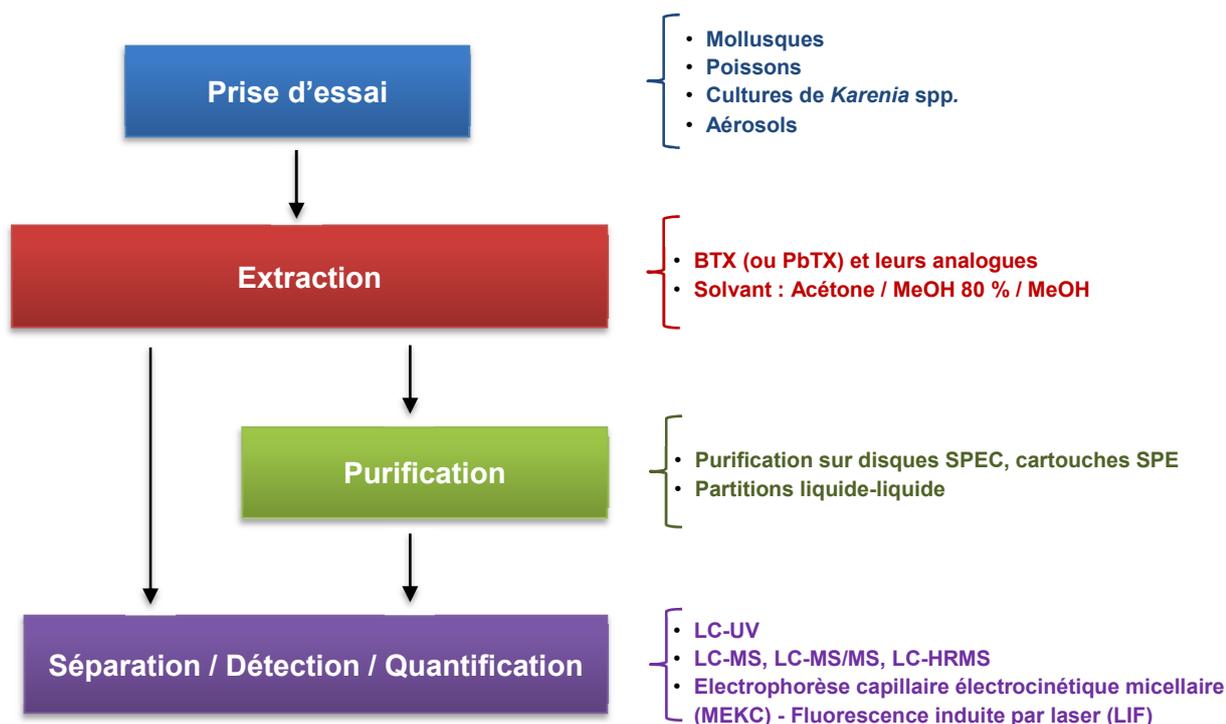


Figure 8 : Schéma général des méthodes physico-chimiques mises en œuvre pour l'analyse des brevétoxines et de leurs analogues

2.3.1.1 Extraction des brevétoxines et de leurs analogues

Cultures de Karenia spp. / Prélèvements d'eau de mer

Depuis le début des années 90, les brevétoxines et leurs analogues sont extraits de cultures de *Karenia* spp. ou d'échantillons d'eau selon des protocoles similaires. Les échantillons sont déposés sur des disques SPEC C₁₈ (disques d'extraction en phase solide) ou sur des cartouches SPE C₁₈ (cartouches d'extraction en phase solide) (Hua *et al.* 1996; Pierce *et al.* 2003; Pierce *et al.* 2005; Abraham *et al.* 2006; Twiner *et al.* 2007; Mead *et al.* 2014). Le conditionnement de ces phases est effectué en deux temps. Le conditionnement de la phase stationnaire est réalisé, dans un premier temps avec un solvant organique (MeOH ou acétone), puis avec de l'eau. Le prélèvement est déposé, puis la phase stationnaire est lavée avec de l'eau. Les brevétoxines et leurs analogues sont ensuite éluées avec du MeOH ou de l'acétone. A l'issue, une étape de concentration est parfois réalisée avant séparation et détection des toxines (évaporation sous N₂ sans chauffage ou via l'utilisation d'un concentrateur sous vide).

Hummert *et al.* (2002) ont opté pour un protocole différent, afin d'évaluer qualitativement la composition toxinique des prélèvements. Un filet à plancton constitué de mailles de 20 µm est employé afin de prélever le plancton. Le filet est ensuite rincé avec de l'eau de mer sur un filtre en fibre de verre. Le filtre est placé dans un vial, puis les toxines sont extraites avec du MeOH 50 %, en ayant recours à un homogénéisateur.

Poissons / Mollusques

Pour les poissons, les prélèvements sont effectués à l'aide de filets ou de lignes de pêche. Les matrices analysées varient en fonction des travaux (muscle, foie, estomac ou viscères) avec des prises d'essai allant de 1 à 10 g. Toutes les méthodes développées pour la matrice « poisson » font appel à une extraction à l'acétone suivie d'une série d'étapes d'évaporation, de reprise dans un solvant organique et de partitions liquide-liquide au n-hexane (pureté 95 %) (Lewis *et al.* 1999) (Dechraoui *et al.* 2005; Naar *et al.* 2007). Une purification SPE sur des cartouches de type Florisil® ou contenant du gel de silice est souvent mise en œuvre avant l'analyse.

Pour les mollusques, les prises d'essai (1 g) sont systématiquement préparées à partir d'homogénat de chair totale. Ces homogénats sont obtenus après décoquillages et broyage mécanique de la chair. Les protocoles d'extraction similaires à ceux mis en œuvre sur la matrice poisson ont initialement été développés (Plakas *et al.* 2002; Dickey *et al.* 2004; Plakas *et al.* 2004; Wang *et al.* 2004; Abraham *et al.* 2006; Abraham *et al.* 2012). La principale différence réside dans le type de phase utilisé pour effectuer la purification SPE (C₁₈ ou phases polymériques de type PS-DVB ou PVP-DVB). Progressivement l'utilisation d'acétone a été remplacée par du MeOH/H₂O 80:20 (v:v) ou du MeOH pur, combinée à l'utilisation d'homogénéisateurs, de vortex ou de billes (Nozawa *et al.* 2003; McNabb *et al.* 2012; Domènech *et al.* 2014; Wu *et al.* 2014; Derrien *et al.* 2018; Dom *et al.* 2018; Shin *et al.* 2018). Compte-tenu de la thermostabilité des brevétoxines, dans certains cas, les extraits sont placés dans un bain-marie à 60°C pendant 20 min (McNabb *et al.* 2012; Shin *et al.* 2018). Après extraction des toxines, les extraits sont, soit purifiés sur cartouche SPE (McNabb *et al.* 2012; Wu *et al.* 2014; Shin *et al.* 2018), soit directement injectés dans le système de mesure (Derrien *et al.* 2018; Dom *et al.* 2018). A noter que seuls McNabb *et al.* (2012) ont conservé une étape de lavage au n-hexane (pureté ≥ 95 % avec une extraction au MeOH/H₂O 80:20 (v:v)). La plus-value de cette étape additionnelle n'est pas évidente lorsque l'on compare les performances analytiques de cette méthode avec celles précédemment citées (Tableau 6).

Aérosols

L'analyse des brevétoxines contenues dans les aérosols passe par le déploiement, pendant plusieurs heures, dans la zone touchée par les efflorescences de *K. brevis*, de capteurs d'air pour piéger les toxines. Des échantillonneurs de volume élevé d'air environnemental (TE-5000, Tisch Environmental Inc., Village of Cleaves, OH, États-Unis) sont mis en place le long de la plage pour collecter de grandes quantités d'aérosols marins pour l'analyse de brevétoxines. Afin de cerner la portée des aérosols, des échantillonneurs d'air peuvent également être placés à quelques km de la plage. Les échantillonneurs sont équipés de filtres en fibre de verre (20 cm x 28 cm) (Whatman EPM 2000, Maidstone, Angleterre). Ils sont placés dans des endroits accessibles pour fournir une alimentation électrique et faciliter le changement quotidien des filtres. En effet, les aérosols sont captés en continu pendant la journée tous les jours pendant plusieurs jours (4 – 6 jours). Ils peuvent être captés également durant la nuit (Cheng *et al.* 2005a ; Kirkpatrick *et al.* 2010).

L'analyse des brevétoxines passe par une étape d'extraction des toxines à partir des filtres. Il peut s'agir d'une extraction à chaud par solvant et en continu des analytes cibles dans un échantillon solide, le plus souvent avec du dichlorométhane ou de l'acétone comme solvant d'extraction (Pierce *et al.*, 2003 ; 2005). Toutefois, une extraction à l'acétone, par agitation et sonication, permet d'obtenir un meilleur taux de récupération pour la BTX-2 (> 50 %) (Cheng *et al.* 2005 a et b). Quelle que soit la méthode mise en œuvre, les extraits obtenus sont évaporés et repris dans du méthanol (MeOH) ou du MeOH/H₂O 50/50 (v/v), en vue d'une analyse par méthode chimique, biologique ou biochimique.

2.3.1.2 Séparation et détection des brevétoxines et de leurs analogues par des méthodes physico-chimiques

Les instruments analytiques utilisés pour l'analyse des brevétoxines reposent sur un couplage entre une technique séparative et une technique de détection. La chromatographie liquide est la technique séparative majoritairement employée. Cette technique peut être couplée à plusieurs types de détecteurs tels que la spectroscopie ultra-violet (LC-UV), la spectrométrie de masse basse ou haute résolution (LC-MS ou LC-HRMS), ou encore en tandem (LC-MS/MS). Un couplage entre l'électrophorèse capillaire électrocinétique micellaire et la fluorescence induite par laser (MEKC-LIF) a également été décrite.

Séparation des brevétoxines et de leurs analogues

Seules les brevétoxines et certains de leurs analogues qui possèdent des propriétés lipophiles ont été recherchées jusqu'à présent. Une séparation par chromatographie liquide haute performance en phase inverse a systématiquement été mise en œuvre. Des colonnes chromatographiques composées de phase stationnaire composées de silices greffées octyl ou octadécyl (respectivement

C₈ ou C₁₈) sont très majoritairement employées. Des conditions de phases mobiles acides ou basiques permettent d'obtenir une excellente séparation chromatographique. Dans la plupart des cas, la composition des phases mobiles est identique à celles employées pour la séparation des biotoxines marines lipophiles réglementées (acide okadaïque, dinophysistoxines, azaspiracides, pecténotoxines et yessotoxines). En voici quelques exemples utilisés avec des colonnes chromatographiques C₁₈ :

- Conditions acides (Hummert *et al.* 2002; Dom *et al.* 2018) :
 - Phase mobile A : formate d'ammonium dans l'eau (2 mM) acidifié par 1,9 % d'acide formique.
 - Phase mobile B : formate d'ammonium dans un mélange acétonitrile/eau 95/5 (v:v) (2 mM) acidifié par 1,9 % d'acide formique.
- Conditions basiques (Domènech *et al.* 2014) :
 - Phase mobile A : ammoniacque dans l'eau (6,7 mM).
 - Phase mobile B : ammoniacque dans un mélange acétonitrile/eau 90/10 (v:v) (6,7 mM).

A noter que l'utilisation de MeOH dans la phase mobile organique (B), au lieu de l'acétonitrile (ACN), permettrait d'améliorer la sensibilité des méthodes d'analyse des brevétoxines (Zendong *et al.* 2015; Dom *et al.* 2018). Un gain d'un facteur 6 à 10 a été constaté (Dom *et al.* 2018). C'est d'ailleurs le choix qui a été effectué par l'Ifremer lors du développement de la méthode analytique mise en œuvre dans le cadre du réseau EMERGTOX (Derrien *et al.* 2018).

Parmi les BTX figurent les dérivés hydrolysés de BTX-1, BTX-2, BTX-3, et BTX-7 (ouverture du cycle A), ou les formes oxydées de BTX-1 et BTX-2. Ces dérivés, de lipophilicité parfois très différentes (cf paragraphe 2.1.2), présentent des abondances relatives élevées dans les prélèvements effectués lors d'efflorescences algales (Abraham *et al.* 2006). Actuellement, aucune méthode analytique n'a spécifiquement été développée pour la recherche de formes hydrophiles. Il est donc probable que de nombreux analogues faiblement lipophiles ou hydrophiles demeurent, encore à ce jour, inconnus. Par ailleurs, l'existence de formes plus lipophiles que les analogues de brevétoxines identifiées avec les méthodes actuelles, ne peut être écartée.

Seul Shea (1997) a opté pour une technique séparative autre que la chromatographie liquide : il s'agit de l'électrophorèse capillaire électrocinétique micellaire (MEKC). Cette technique permet également d'obtenir une excellente séparation entre les BTX-2, BTX-3, BTX-5, et BTX-9.

Détection des brevétoxines et de leurs analogues

Une détection par spectroscopie UV a été mise en œuvre afin de quantifier les BTX-1, BTX-2, BTX-3, BTX-6 et BTX-9 dans des échantillons d'eau de mer ou de cultures de *K. brevis* (Baden et Tomas 1988; Pierce *et al.* 1992; Hua *et al.* 1995; Hua *et al.* 1996; Brousseau *et al.* 1998; Holland *et al.* 2012). Cette technique peut cependant souffrir de la présence d'interférents co-éluants qui possèdent également des groupements chromophores (Hua *et al.* 1996).

La fluorescence induite par laser (LIF ; couplée à l'électrophorèse capillaire électrocinétique micellaire) a également été appliquée pour l'analyse de cultures de *K. brevis* (Shea 1997). Bien que cette technique soit extrêmement sensible (limite de détection (LD) de 4 ng BTX-2/ kg de chair de poissons), elle nécessite la mise en œuvre d'étapes de dérivation/réduction.

La spectrométrie de masse est la technique de détection la plus couramment employée parmi les techniques de détection physico-chimiques existantes. Ces systèmes sont composés d'analyseurs dits de basse (simple quadripôle) ou haute résolution (ToF, Orbitrap). La source d'ionisation de type électrospray (ESI) est la plus adaptée et donc la plus couramment utilisée pour l'analyse des biotoxines marines. Cette source est donc celle majoritairement employées pour la recherche des brevétoxines. Néanmoins, la source d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI), bien que peu étudiée, semble constituer une alternative extrêmement intéressante pour l'analyse des brevétoxines les moins polaires. L'APCI permet d'obtenir une meilleure sensibilité que l'ESI pour la BTX-2 (Mead *et al.* 2014).

Plusieurs modes d'acquisition du signal peuvent être employés en fonction des objectifs à atteindre (Tableau 4).

Tableau 4 : Modes d'acquisition du signal appliqués en spectrométrie de masse pour la détection des brevétoxines et de leurs analogues

Mode de balayage	Objectif	Source
<p>Full scan.</p> <p>Mode d'acquisition du signal appliqué en spectrométrie de masse permettant le balayage de toutes les masses comprises entre deux valeurs m/z pré-programmées</p>	<p>Acquisition sans <i>a priori</i> permettant l'identification de BTX et de leurs analogues. Ce mode d'acquisition offre la possibilité de conduire des analyses rétrospectives.</p> <p>Permet d'obtenir la masse moléculaire des composés.</p> <p>Les informations structurales sont limitées bien que plus riches en haute résolution qu'en basse résolution.</p>	<p>Basse résolution : (Hua <i>et al.</i> 1995; Hua <i>et al.</i> 1996; Hua et Cole 1999, 2000; Plakas <i>et al.</i> 2002; Nozawa <i>et al.</i> 2003; Dickey <i>et al.</i> 2004; Plakas <i>et al.</i> 2004; Wang <i>et al.</i> 2004; Abraham <i>et al.</i> 2006; Twiner <i>et al.</i> 2007; Abraham <i>et al.</i> 2012; McNabb <i>et al.</i> 2012; Mead <i>et al.</i> 2014)</p> <p>Haute résolution : (Domènech <i>et al.</i> 2014; Zendong <i>et al.</i> 2014; Dom <i>et al.</i> 2018)</p>
<p>Selected ion monitoring (SIM). mode d'acquisition du signal appliqué en spectrométrie de masse mono-dimensionnelle permettant de suivre tous les ions entre deux valeurs m/z pré-programmées</p>	<p>Quantification de BTX et de leurs analogues.</p>	<p>(Hummert <i>et al.</i> 2002; Twiner <i>et al.</i> 2007)</p>
<p>Multiple reaction monitoring (MRM) ou Selected reaction monitoring (SRM)</p>	<p>Quantification de BTX et de leurs analogues avec une sensibilité et une spécificité plus élevée qu'avec le mode de balayage SIM ou Full scan.</p>	<p>(Nozawa <i>et al.</i> 2003; McNabb <i>et al.</i> 2012; Wu <i>et al.</i> 2014; Derrien <i>et al.</i> 2018; Shin <i>et al.</i> 2018; Gerssen 2020)</p>
<p>Product ion scan (PIS) : mode d'acquisition du signal appliqué en spectrométrie de masse permettant à partir d'un ion précurseur de suivre tous les ions produits entre deux valeurs m/z pré-programmées ou Enhanced product ion scan (EPI). Ce mode permet de piéger les ions produits dans la trappe ionique afin d'obtenir une meilleure sensibilité. ou All ion fragmentation (AIF - Spécifique aux systèmes hybrides quadripôle/orbitrap). Ce mode permet la fragmentation des ions précurseurs sans discrimination.</p>	<p>Identification de structures développées de BTX ou d'analogues via l'obtention de spectres MS² et l'étude des mécanismes de fragmentation.</p>	<p>Basse résolution : (Hua et Cole 2000; Nozawa <i>et al.</i> 2003; Wang <i>et al.</i> 2004; Abraham <i>et al.</i> 2006; Twiner <i>et al.</i> 2007; Abraham <i>et al.</i> 2012; McNabb <i>et al.</i> 2012; Wu <i>et al.</i> 2014)</p> <p>Haute résolution : (Domènech <i>et al.</i> 2014; Zendong <i>et al.</i> 2014; Dom <i>et al.</i> 2018)</p>

Les masses des ions précurseurs $[M+H]^+$ et des principaux ions produits des brevétoxines 1 à 9 sont indiquées, à titre informatif, dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Masses des ions précurseurs $[M+H]^+$ des brevétoxines 1 à 9 et de leurs principaux ions produits identifiés par Wu et al. (2014).

Toxine	Masse de l'ion précurseur (m/z)	Masse des ions produits (m/z)
BTX-1	867.5 $[M+H]^+$	849,4 / 221,1
BTX-2	895.5 $[M+H]^+$	877,4 / 859,6
BTX-3	897.5 $[M+H]^+$	825,3 / 725,2
BTX-5	937.5 $[M+H]^+$	893,3 / 875,2
BTX-6	911.5 $[M+H]^+$	893,6 / 875,3
BTX-7	869.5 $[M+H]^+$	779,4 / 151,2
BTX-8	917.4 $[M+H]^+$	-
BTX-9	899.5 $[M+H]^+$	863,5 / 157,1

Ces dernières années, du fait de l'émergence de la spectrométrie de masse haute résolution dans le domaine de la sécurité sanitaire des aliments, plusieurs méthodes reposant sur ce type d'analyseur de masse ont vu le jour. Les technologies hybrides Q-Tof et Q-Orbitrap ont été appliquées (Fang *et al.* 2004; Domènech *et al.* 2014; Zendong *et al.* 2015; Dom *et al.* 2018). L'acquisition en full scan permet à ces systèmes la détection sans *a priori* d'un nombre illimité de composés tout en offrant la possibilité de mener des analyses rétrospectives. Ceci est impossible lorsqu'un mode d'acquisition avec *a priori* est utilisé comme, par exemple, le mode MRM avec un spectromètre de masse triple-Quadripôles. Ils fournissent également une grande sélectivité, or cette caractéristique est précieuse lorsqu'il s'agit de rechercher des traces de molécules dans des matrices complexes (composées de milliers d'interférents). La précision en masse, les profils isotopiques et la construction de bibliothèques de spectres MS/MS permettent d'obtenir un haut niveau de sélectivité. Ces instruments sont également très intéressants pour aider à la détermination de la formule brute et à l'élucidation structurale de brevétoxines et de leurs analogues. En fonction de l'objectif souhaité, trois stratégies peuvent être mises en oeuvre (Gonzalez-Romero *et al.* 2017) :

- Un criblage ciblé pour l'identification et la quantification de molécules pour lesquelles un étalon est disponible.
- Un criblage de composés « suspects » pour tenter d'identifier un composé pour lequel aucun étalon n'est disponible.
- Un « criblage non ciblé/non-targeted screening » : avec pour objectif l'identification de la formule brute d'un composé d'intérêt ou de sa structure potentielle, lorsque l'on ne dispose ni d'informations initiales, ni d'étalons. Les échantillons analysés sont comparés avec un ou plusieurs échantillons de contrôle. La mise en oeuvre d'un traitement statistique, d'algorithmes ou la recherche dans des bases de données moléculaires peuvent permettre d'identifier des structures chimiques similaires, et ainsi aider à identifier le composé d'intérêt (Dom *et al.* 2018).

A ce jour, le manque d'étalons constitue un frein majeur pour la recherche et la quantification des brevétoxines et de leurs analogues avec des méthodes physico-chimiques. Seules les étalons des BTX-1, BTX-2, BTX-3, BTX-9 et BTX B5 sont commercialisés, et la teneur de ces étalons n'est pas certifiée. Même si l'utilisation de la spectrométrie de masse haute-résolution en mode « suspect

screening » ou « non-targeted-screening » peut s'avérer une alternative intéressante en l'absence d'étalons, l'identification formelle des toxines ne peut pas être garantie.

2.3.1.3 Performances des méthodes d'analyse physico-chimiques

Dickey *et al.* (2004) ont conduit une étude inter-laboratoires (n = 5 participants) afin d'étudier les performances analytiques de la méthode LC-MS développée par Plakas *et al.* (2002). Bien que les lignes directrices de l'AOAC ou de l'ISO en matière de validation inter-laboratoires n'aient pas été rigoureusement respectées, un taux de récupération moyen de 78 % et une reproductibilité moyenne de 44 % ont été obtenus pour la BTX-3. Plusieurs méthodes LC-HRMS et LC-MS/MS ont fait l'objet de validations intra-laboratoire (Fang *et al.* 2004; McNabb *et al.* 2012; Wu *et al.* 2014; Derrien *et al.* 2018; Shin *et al.* 2018; Gerssen 2020). Le détail des performances de ces méthodes est donné dans le Tableau 6. Globalement, les limites analytiques (sensibilité) obtenues, sont bien plus élevées que celles observées pour les autres biotoxines marines lipophiles (toxines des groupes de l'acide okadaïque, des yessotoxines, des azaspiracides, des imines cycliques, etc.) (Wu *et al.* 2014; Derrien *et al.* 2018; Dom *et al.* 2018).

La méthode mise en œuvre dans le cadre du réseau EMERGTOX possède une excellente justesse et fidélité (Derrien *et al.* 2018). Les taux de récupération moyens observés sont compris entre 93 et 104 % pour la BTX-2 et la BTX-3, et la fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire) est inférieure à 8 %. De telles performances sont très satisfaisantes. Il est d'ailleurs, important de noter qu'il s'agit d'une méthode large spectre, permettant de rechercher les toxines appartenant à plusieurs groupes (acide okadaïque, yessotoxines, pecténocines, azaspiracides, spirolides, pinnatoxines, gymnodimines, palytoxines et microcystines). Inévitablement, la recherche simultanée d'un si grand nombre d'analogues, impacte négativement la sensibilité.

Tableau 6 : Performances comparées des méthodes LC-HRMS et LC-MS/MS d'analyse des brevétoxines dans les coquillages caractérisées en intra-laboratoire

Référence	Fang <i>et al.</i> (2004)	McNabb <i>et al.</i> (2012)	Wu <i>et al.</i> (2014)	Derrien <i>et al.</i> (2018) Méthode EMERGTOX	Shin <i>et al.</i> (2018)	Gerssen (2020)
Mode d'acquisition	Precursor ion scan	MRM	MRM	MRM	MRM	MRM
Toxines caractérisées	BTX-2	BTX-2, BTX-3, BTX-B2, BTX-B5, S-deoxy-BTX-B2	BTX-1, BTX-2, BTX-3, BTX-5, BTX-6, BTX-7, BTX-9	BTX-2, BTX-3	BTX-1, BTX-2, BTX-3	BTX-2, BTX-3, BTX-9
Justesse	91 à 94 %	77 à 112 % (excepté BTX-2 : 61 %) *	71 à 91 %	93 à 104 %	76 à 106 %	94 à 114 %
Répétabilité	/	/	CV < 11 %	CV < 8 %	CV < 9 %	CV < 16 %
Fidélité intermédiaire	CV < 12 %	CV < 18% (excepté BTX-2 : 27 %)	/	CV < 8 %	CV < 6 %	/
LD	/	25 à 48 µg/kg CT	0,06 à 13,6 µg/kg CT	23 µg/kg GD	7 µg/kg CT	BTX-2, BTX-3 : 150 µg/kg CT / BTX-9 : 40 µg/kg CT
LQ	100 µg/kg CT	32 à 61 µg/kg CT	0,2 à 45 µg/kg CT	70 µg/kg GD	25 µg/kg CT	200 µg/kg CT

Les méthodes développées jusqu'à présent se sont essentiellement focalisées sur la recherche des principales brevétoxines produites par *Karenia* spp. Il s'agissait donc de méthodes adaptées à la recherche de composés lipophiles. Afin d'obtenir une vision plus exhaustive des métabolites existants, des protocoles d'extraction large spectre devront être développés. Cela permettra certainement d'identifier de nouvelles formes possédant des propriétés hydrophiles.

Parmi les techniques physico-chimiques existantes, la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse est la technique la plus adaptée pour la recherche des brevétoxines. Son utilisation en mode d'acquisition MRM permet une détection et une quantification avec d'excellentes performances analytiques (justesse, fidélité, sensibilité, spécificité). D'autre part, l'utilisation de système HRMS sans *a priori* (modes d'acquisitions non ciblés) permet d'obtenir des informations structurales riches ou d'identifier un composé pour lequel aucun étalon n'est disponible. Ce dernier point est précieux compte-tenu du manque d'étalons de brevétoxines.

2.3.2 Méthodes biochimiques

Des tests de liaison spécifique (RBA) et des tests immunologiques (RIA, ELISA) sont utilisés pour la recherche de BTX dans les algues, l'eau, les coquillages et les poissons.

2.3.2.1 Test de fixation spécifique (Receptor binding assay (RBA))

Le test de fixation spécifique est basé sur les propriétés pharmacologiques des BTX à se fixer sur les canaux sodium sensibles au potentiel de membrane (canaux Na_v). Les concentrations en BTX dans un extrait sont déterminées par expériences de compétition entre les BTX contenues dans un extrait et une BTX radiomarquée (van Dolah *et al.* 1994; Bottein *et al.* 2011; Bottein et Clausen 2017; Abraham *et al.* 2018) pour leur site de liaison. Pour cela des préparations membranaires riches en canaux Na_v sont utilisées, préparées à partir de cerveau de rat ou de porc ou plus rarement de cellules (par exemple des neuroblastomes). Cette méthode a été développée dans deux formats différents, l'un utilisant des tubes à essais, l'autre des microplaques qui permet d'envisager un plus haut débit. La limite de détection (LD) a été estimée à 70 µg eq. BTX-3/kg de chair de coquillage (Fire *et al.* 2008a), sensibilité suffisante pour cribler les coquillages. La FAO/OMS/COI rapporte une LD de 30 µg/kg équivalent BTX-3, sans fournir de référence. Le taux de récupération à partir d'échantillons enrichis avec de la BTX-3 a été estimé à 136% et les variabilités inter-et intra-laboratoire à 23% et 16%, respectivement (Dickey *et al.* 2004).

Le RBA est listé comme une méthode d'analyse provisoire de type IV⁴ par le Codex alimentarius.

Le RBA présente l'avantage d'être rapide (3 h) et simple à opérer en laboratoire. Il a été utilisé sur différentes matrices (poissons (Fire *et al.* 2008a), extrait de *K. brevis* (Roth *et al.* 2007; Twiner *et al.* 2007)).

Cette méthode, spécifique des composés se fixant sur le site 5 des canaux Na_v (Figure 34), rapporte une concentration totale exprimée en équivalent d'une toxine standard, le plus souvent la BTX-3. Ceci peut être un inconvénient car la méthode ne permet pas de différencier ni d'identifier les analogues de BTX, et ne discrimine pas non plus les BTX des ciguatoxines (CTX), parfois présentes dans la même zone géographique. Cependant la spécificité du RBA à tous les composés du site 5 peut aussi présenter des avantages car tous les analogues de BTX sont détectables par RBA, et la réponse mesurée, qui dépend de l'affinité des analogues pour leur site de liaison, sera indicatrice de la toxicité globale d'un échantillon. Par exemple la biotransformation des brevétoxines par ajout d'acides aminés conduit à des molécules de moindre affinité et toxicité alors que la conjugaison aux

⁴ Une méthode de Type IV est une méthode traditionnelle ou encore une méthode d'application récente, mais pour laquelle on n'a pas encore déterminé les critères exigés par le Comité sur les méthodes d'analyse et d'échantillonnage.

acides gras conduit à une augmentation de l'affinité pour les canaux Na_v et de la toxicité. Les S-désoxy-BTX-B2 (cysteine-BTX-B) et BTX-B2 (cystéine-BTX-B sulfoxyde) sont les métabolites les plus persistants dans l'huître. A noter que la présence de forte concentration de brevénal peut moduler la réponse toxique car ce composé se fixe sur le site récepteur des brevétoxines sans induire d'effet.

Compte tenu de la difficulté à développer par des approches physico-chimiques des méthodes couvrant un large spectre de métabolites de BTX, dotés de propriétés très diverses, mais aussi la faible disponibilité d'étalons, le RBA présente un avantage certain.

Un RBA utilisant une BTX fluorescente (différents marqueurs dont BODIPY®-PbTx-2 (McCall *et al.* 2012; McCall *et al.* 2014) a été récemment mis au point comme outil d'étude des affinités des composés spécifiques du site 5 des canaux Na_v. Cette méthode prometteuse a été mise au point pour des toxines purifiées mais n'a cependant pas été évaluée pour ses performances de détection des BTX dans des matrices algales ou animales. De plus, à la connaissance du GT, aucune information n'a été communiquée quant à sa sensibilité.

2.3.2.2 Tests immunologiques

Contrairement au test de fixation spécifique dont les résultats reflètent la toxicité globale d'un extrait, les tests immunologiques sont basés sur la reconnaissance d'une structure chimique spécifique des BTX (épitope) par des anticorps (monoclonaux ou poly-clonaux). Deux formats de tests immunologiques ont été développés, l'un utilisant la radioactivité (RIA), l'autre une enzyme (ELISA).

Radioimmunoassay (RIA)

Le RIA pour les BTX repose sur une interaction compétitive entre une BTX-3 tritiée et les BTX contenues dans un échantillon, sur des anticorps anti-BTX-2-fetuin de sérum immun de mouton (Poli *et al.* 1995). Après incubation, les BTX fixées aux anticorps sont précipitées par l'utilisation de SAC-cel puis filtrées afin de mesurer la radioactivité résiduelle. Cette méthode a été appliquée à l'analyse de toxines dans différentes matrices (sang frais et séché (Woofter *et al.* 2003), urine, et coquillages (Poli *et al.* 2000; Terzagian 2006). Le GT n'a pas identifié d'information sur les performances de cette méthode.

ELISA

Un test ELISA utilisant un serum immun contenant des anticorps anti-BTX (Poli *et al.* 1995) a été développé (Garthwaite *et al.* 2001; Maucher *et al.* 2007). Avec une dilution au 1/100 d'un extrait, ce test ELISA satisfait une détection en-dessous de la limite réglementaire aux USA de 80 µg/100g (Garthwaite *et al.* 2001). La limite de détection dans le sang a été estimée à 1 ng eq. BTX-3/mL avec un taux de récupération de 58%. Cette méthode permet la détection par réaction croisée des conjugués cysteine (m/z 1018) et cysteine sulfoxyde (m/z 1034) (Maucher *et al.* 2007).

Un autre test ELISA développé par Naar *et al.* (2002) utilise des anticorps polyclonaux préparés à partir de BTX-3-KLH. Il a été évalué sur de nombreuses matrices telles que les chairs de coquillage, l'eau de mer, des échantillons biologiques humains.

Ce test est sensible, avec une limite de détection de 25 µg/kg chair de coquillage. Les performances sont donc adéquates aux besoins. Il est spécifique, cependant les anticorps disponibles reconnaissent les BTX de type B et n'ont que très peu de réactivité croisée avec les BTX de type A (Abraham *et al.* 2015). Dans Flewelling *et al.* (2020), la limite de quantification est de 120 µg/kg. Le taux de récupération à partir d'échantillons enrichis avec de la BTX-3 a été estimé à 87% et les variabilités inter-et intra-laboratoire à 16% et 10%, respectivement (Dickey *et al.* 2004).

Les tests ELISA ont été développés en format microplaque à haut débit.

Un kit ELISA commercialisé par Abraxis possède une réactivité croisée avec les BTX de type B avec les taux suivants : BTX-3 : 100% ; Deoxy BTX-2 : 133% ; BTX-5 : 127% ; BTX-2 : 102% ; BTX-9 : 83% ; BTX-6 : 13% ; BTX-1 : 5%.

2.3.3 Méthodes biologiques

Différentes méthodes biologiques sont utilisées pour la détection des BTX dans les coquillages, notamment le bio-essai sur souris, le bio-essai sur poisson, ainsi que divers tests *in vitro*.

2.3.3.1 Bioessais *in vivo* pour l'analyse des BTX

Le bio-essai sur souris

Ce test est encore utilisé pour la surveillance des coquillages aux Etats-Unis. Il est désormais recommandé de la réaliser via un test ELISA (Food and Drug Administration (FDA) 2017, 2019) pour des raisons éthiques et de sensibilité. Dans ce test, la toxicité globale d'un extrait (par le diéthyl-éther) injecté par voie intrapéritonéale est évaluée de manière semi-quantitative sur la base du temps de survie. Le résultat est exprimé en unité souris (protocole APHA basé sur la méthode développée par McFarren *et al.* (1965), IOC Manuals & Guides 1995 n°33 (Fernandez et Cembella 1995)). Une unité souris (US) correspond à la quantité d'extrait brut causant la mort de 50% des souris (20 g) en 930 minutes (15,5 h). En pratique, le niveau qui a été utilisé pour l'interdiction de la récolte de coquillages aux Etats-Unis a été de 20 US dans 100 g de chair de coquillage. Par la suite, les US ont été converties en équivalents BTX-2 en utilisant la conversion de 4,0 µg BTX-2 pour 1 US. Ainsi, les données ont été normalisées en équivalent BTX-2 (Baden *et al.* 1982; Dickey *et al.* 1999).

Les symptômes observés chez la souris incluent notamment une hyper-réactivité, une paralysie de l'arrière train, des difficultés respiratoires (dyspnée), une augmentation de la salivation (sialorrhée), des larmolements, une miction continue, la défécation et une paralysie généralisée. La mort survient par arrêt respiratoire (voir section 4.4 Toxicité *in vivo*).

Le bio-essai sur poisson

Ce test utilise des poissons d'aquarium de petite taille (3-5 cm), comme le guppy (*Poecilia reticulata*), la gambusie (*Gambusia affinis*) également appelée poisson-moustique (Baden *et al.* 1979). Ce test permet l'évaluation de la toxicité de BTX chez le poisson et de déterminer les DL₅₀ et DL₁₀₀. Pour cela, la BTX à l'étude est ajoutée à une concentration donnée et dans un volume d'eau connu et la mortalité des poissons est évaluée après 1 h ou après 24 h. L'absorption des BTX ajoutées dans le milieu se fait à travers l'épithélium gastro-intestinal et l'épithélium cutané ou branchial. La DL₅₀ établie après 1 h pour la BTX-1 chez le guppy est de 4 ng/mL (Shimizu *et al.* 1986). La DL₅₀ établie après 24 h est de 2-4 ng/mL.

Les symptômes observés chez le poisson lors de l'action des BTX incluent des torsions initiales vigoureuses du corps, une nage dite « en tire-bouchon », des contractions musculaires spontanées, défécation, régurgitation, courbure de la queue, paralysie des nageoires pectorales, mouvements lents et irréguliers, tranquillité, vasodilatation, convulsions soudaines, menant à la mort par arrêt respiratoire.

2.3.3.2 Bio-essais *in vitro* pour l'analyse des BTX

Plusieurs tests de cytotoxicité ont été développés pour déterminer la présence de BTX dans les coquillages (Manger *et al.* 1993; Manger *et al.* 1994; Manger *et al.* 1995; Trainer *et al.* 1995; Bottein Dechraoui *et al.* 2007; Bottein *et al.* 2010). Ces divers tests, basés sur l'interaction des BTX avec les canaux Na_v, sont à la fois plus spécifiques et sensibles que le bio-essai souris. La stratégie de ces tests inclut l'utilisation de lignées cellulaires de neuroblastomes traitées avec de la vératridine, un alcaloïde végétal, pour activer les canaux Na_v, et avec de l'ouabaïne pour inhiber la Na/K ATPase membranaire. Dans ces conditions, les BTX se lient au canal Na_v ouvert par la vératridine et augmentent l'influx d'ions Na⁺. La viabilité cellulaire est mesurée en utilisant la réduction métabolique du substrat chromogène MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl-tetrazolium) en formazan par les deshydrogénases mitochondriales, proportionnellement au nombre de cellules vivantes (Manger *et al.* 1993; Plakas et Dickey 2010). Une limite de détection (LD) pour le test de cytotoxicité sur coquillages pour la BTX-1 de 0,25 mg/kg a été indiquée par Manger *et al.* (1993), alors que

Dickey *et al.* (2004) indique dans une étude entre divers laboratoires pour le même test une grande variabilité dans les limites de détection.

2.3.4 Biocapteurs

Au cours des 20 dernières années, plusieurs types de biocapteurs permettant la détection des brevétoxines ont vu le jour. Ces différents biocapteurs reposent sur des technologies et des principes innovants :

- Les biocapteurs basés sur les réseaux de neurones (Kulagina *et al.* 2006). Des neurones de mammifères (souris) sont cultivés et s'étendent sur des microélectrodes, après perfusion de la solution étalon ou de l'échantillon, l'activité bioélectrique du réseau est surveillée (de manière non invasive). Ce type de biocapteurs a été testé avec succès sur des échantillons d'eau de mer lors d'efflorescence de *Karenia* et des extraits de cultures d'algues avec une sensibilité élevée (LD de 11 µg BTX-3/L d'eau de mer). Ils n'ont cependant pas été testés sur des matrices biologiques plus complexes (ex coquillages, poisson...).
- Les biocapteurs par résonance plasmonique de surface (Mouri *et al.* 2009). Le fonctionnement de ces biocapteurs nécessite l'utilisation de yessotoxine désulfatée immobilisée sur une puce et de phosphodiesterase (PDEII) afin de détecter la BTX-2, par inhibition. A ce jour, ce type de biocapteur a seulement été testé sur des solutions étalons de BTX-2.
- Les biocapteurs à base d'aptamères (Eissa *et al.* 2015; Weng et Neethirajan 2018; Ye *et al.* 2019). Ces biocapteurs sont combinés à une détection par fluorescence. Ces dernières années, les aptamères émergent comme outil de détection. Ils permettent d'obtenir une sensibilité et une spécificité intéressantes tout en étant peu onéreux et rapides d'utilisation. Ces biocapteurs ont été appliqués sur des extraits de mollusques supplémentés en BTX-2 entre 0,1 et 100 ng/mL. Des taux de récupération satisfaisants ont été obtenus (compris entre 102 et 107 %) (Eissa *et al.* 2015).

Toutefois, à ce jour, ces biocapteurs ne sont pas commercialisés, et certains d'entre eux en sont toujours au stade du développement. A terme, ils pourraient constituer une alternative aux techniques analytiques actuelles.

2.3.5 Bilan des méthodes analytiques

Tableau 7 : Synthèse des performances, des avantages et des inconvénients des méthodes d'analyse mises en œuvre pour l'analyse des brevétoxines

Type de méthode	Technique	Performances	Avantages	Inconvénients
Méthodes physico-chimiques	LC-UV	LD comprise entre 9,9 et 19,8 µg/L d'eau pour les BTX-1, BTX-2 et BTX-3 (Hua <i>et al.</i> 1996)	<ul style="list-style-type: none"> • Identification possible des analogues 	<ul style="list-style-type: none"> • Moins sensible que les méthodes LC-MS(/MS) • Spécificité limitée avec des matrices complexes (poissons, mollusques, etc). La présence d'interférences peut être problématique. Cette technique a essentiellement été appliquée sur des matrices relativement « propres » (prélèvements d'eau de mer lors des efflorescences algales, extraits de cultures de <i>Karenia</i> spp.) • Disponibilité des étalons (très peu d'étalons de brevétoxines sont commercialisés).
	MEKC-LIF Electrophorèse capillaire électrocinétique micellaire couplée à une détection par fluorescence induite par laser	<ul style="list-style-type: none"> • LD de 4 ng BTX-2/ kg de chair de poissons • Fidélité intermédiaire pour BTX-2, BTX-3, BTX-5 : < 2% (27 % pour BTX-9). 	<ul style="list-style-type: none"> • Méthode extrêmement sensible 	<ul style="list-style-type: none"> • Nécessite la mise en œuvre d'une étape de dérivation ou de réduction. • Méthode développée par Shea (1997), mais jamais reprise dans d'autres travaux. • Disponibilité des étalons (très peu d'étalons de brevétoxines sont commercialisés).
	LC-MS (simple quadripôle)	<p>Performances obtenues en LC-MS lors d'un essai inter-laboratoires (Dickey <i>et al.</i> 2004) :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Taux de récupération moyen de 78 % • Reproductibilité : CV moyen = 44 % <p>Sensibilité obtenue par Hummert <i>et al.</i> (2002) et Plakas <i>et al.</i> (2004):</p> <ul style="list-style-type: none"> • LD instrumentale comprise de 15 ng/mL (soit 7,5 µg/kg de chair totale de mollusques), et de 600 ng/mL (soit 600 ng/mL d'extrait algal). 	<ul style="list-style-type: none"> • Détection individuelle des analogues ou balayage d'un large spectre de masses moléculaires (en fonction du mode d'acquisition sélectionné). 	<ul style="list-style-type: none"> • Spécificité limitée en présence d'interférents co-éluant et isobariques. • Les informations structurales sont limitées (permet uniquement de connaître la masse moléculaire des analogues, à moins de programmer de la fragmentation en source). • Disponibilité des étalons (très peu d'étalons de brevétoxines sont commercialisés).

Type de méthode	Technique	Performances	Avantages	Inconvénients
Méthodes physico-chimiques	LC-MS/MS (Triple-quadrupôle, Q-Trap)	Performances obtenues en LC-MS/MS pour les BTX-1, BTX-2, BTX-3, BTX-B2, BTX-B5, S-deoxy-BTX-B2 et BTX-9 (McNabb <i>et al.</i> 2012; Derrien <i>et al.</i> 2018; Shin <i>et al.</i> 2018; Gerssen 2020) : <ul style="list-style-type: none"> Taux de récupération entre 76 % et 112 % Répétabilité < 16 % Fidélité intermédiaire < 27 % LD entre 7 et 150 µg/kg LQ entre 25 et 200 µg/kg 	<ul style="list-style-type: none"> Spécificité élevée de par la séparation chromatographique des toxines et la détection individuelle des analogues par spectrométrie de masse (MS, MS/MS). Sensibilité élevée. Obtention d'informations structurales. Identification de brevétoxines ou d'analogues via l'obtention de spectres MS² et l'étude des mécanismes de fragmentation. 	<ul style="list-style-type: none"> Coût de l'équipement. Nécessité de disposer d'un personnel qualifié. Disponibilité des étalons (très peu d'étalons de brevétoxines sont commercialisés).
	LC-HRMS (Q-ToF, Q-Orbitrap)	Performances obtenues par Fang <i>et al.</i> (2004) pour la BTX-2 : <ul style="list-style-type: none"> Taux de récupération : 91 à 94 %. Fidélité intermédiaire : CV compris entre 11 et 12% LQ : 100 µg/kg Sensibilité obtenue par Dom <i>et al.</i> (2018) pour la BTX-2 : <ul style="list-style-type: none"> LD : 280 à 324 µg/kg de chair totale et 300 à 337 µg/kg de chair. 	<ul style="list-style-type: none"> Spécificité élevée notamment grâce à la précision en masse de ces instruments. Obtention d'informations structurales. Ces informations peuvent aider à identifier des analogues de brevétoxines pour lesquels les étalons ne sont pas disponibles (spectres MS² haute résolution, étude des mécanismes de fragmentation, etc.) 	<ul style="list-style-type: none"> Coût de l'équipement. Nécessité de disposer d'un personnel hautement qualifié. Disponibilité des étalons (très peu d'étalons de brevétoxines sont commercialisés). Souvent moins sensible que la LC-MS/MS.
Méthodes biochimiques (<i>in vitro</i>)	RBA	LD : 70 µg/kg de chair de coquillage (Fire <i>et al.</i> 2008)	<ul style="list-style-type: none"> Spécifique Facile à mettre en œuvre Haut débit Faible coût de l'équipement. Méthode rapide (résultats obtenus en 2h). Détection éventuelle de nouveaux analogues des toxines recherchées. 	<ul style="list-style-type: none"> Manque de spécificité (ne permet pas d'obtenir d'informations sur l'identité des toxines et de distinguer les brevétoxines des autres toxines possédant le même mode d'action, ce qui peut dans certains cas constituer un avantage). Utilisation de radioactivité (tritium sous le seuil d'exemption).
	RIA	LD : 2.25 ± 0.62 ng/mL eq . BTX-3 dans le sang. Le GT n'a pas identifié d'information sur les performances de cette méthode dans les coquillages.	<ul style="list-style-type: none"> Facile à mettre en œuvre Permet la détection éventuelle de nouveaux analogues des toxines recherchées. 	<ul style="list-style-type: none"> Manque de spécificité (ne permet pas d'obtenir d'informations sur l'identité des toxines et de distinguer les brevétoxines des autres toxines possédant le même mode d'action, ce qui peut dans certains cas constituer un avantage). Anticorps non commercialisés Utilisation de radioactivité (tritium sous le seuil d'exemption)
	ELISA	LD : 1 ng eq BTX-3 /mL dans le sang, taux de récupération de 58%. (Maucher <i>et al.</i> 2007). LD : 25 µg/kg chair de coquillages (Abraham <i>et al.</i> 2015). LQ : 120 µg/kg dans les recouvrement à partir d'échantillons enrichis avec	<ul style="list-style-type: none"> Facile à mettre en œuvre Haut débit Commercialisé sous forme de kit Permet la détection par réaction croisée des conjugués cysteine et cysteine sulfoxyde Permet la détection éventuelle de nouveaux 	<ul style="list-style-type: none"> Manque de spécificité intra-BTX (ne permet pas d'obtenir d'informations sur l'identité des brevétoxines) Très peu de réactivité croisée avec les BTX de type A

Type de méthode	Technique	Performances	Avantages	Inconvénients
Méthodes biochimiques (in vitro)	ELISA (suite)	de la BTX-3 estimé à 87% (Flewelling <i>et al.</i> 2020). Variabilités inter-et intra-laboratoire à 16% et 10%, respectivement (Dickey <i>et al.</i> 2004). Un kit ELISA commercialisé possède une réactivité croisée avec les BTX de type B avec les taux suivants : BTX-3 : 100% ; Deoxy BTX-2 : 133% ; BTX-5 : 127% ; BTX-2 : 102% ; BTX-9 : 83% ; BTX-6 : 13% ; BTX-1 : 5%.	analogues des toxines <ul style="list-style-type: none"> • Bonne spécificité pour les BTX • Sensible 	
Méthodes biologiques (in vitro)	Bio-essai cellulaire fonctionnel sur neuroblastome N2a	LD : 0,25 mg/kg de poissons (BTX-3) (Manger <i>et al.</i> 1995; Dickey <i>et al.</i> 1999). LD : 0,25 mg/kg de coquillages (BTX-1) (Manger <i>et al.</i> 1993) Test quantitatif de cytotoxicité Répétabilité, basée sur le coefficient de variation < 6 %.	<ul style="list-style-type: none"> • Facile à mettre en œuvre par personnel qualifié • Nécessite peu d'équipements (salle de culture et spectromètre) • Utilisable en microplaques (96 à 384 puits), à haut débit et automatisable. • Rapidité relative (de 4 h à 4 jours) • Permet détection d'analogues fonctionnels activateurs de canaux Na_v avec une bonne sensibilité. 	<ul style="list-style-type: none"> • Ne permet pas de connaître l'identité des toxines présentes. • LD variable selon laboratoire et protocole expérimental. • Manque de standardisation des protocoles expérimentaux • Pour détecter les BTX nécessite la présence d'ouabaine et de veratridine. <p>La détection dépend : (i) de la densité cellulaire, (ii) de la viabilité cellulaire des neuroblastomes N2a en l'absence et présence d'ouabaine et de vératridine, (iii) du temps d'incubation avec le réactif métabolique MTT, (iv) de la concentration d'ouabaine et de vératridine utilisées, (v) de la Concentration des solvants utilisés pour extraire les BTX ((MeOH et DMSO), (v) de l'éventuel effet matrices, selon le solvant utilisé (pour des détail sur l'optimisation du test (Truman <i>et al.</i> 2002; Viallon <i>et al.</i> 2020).</p>
Méthodes biologiques (in vivo)	Bioessai sur souris	<ul style="list-style-type: none"> • LD : 10 US/100 g si respect du temps (15,5 h) d'observation ; en pratique LD : plutôt 20 US/100 g car 6 h d'observation (voire 30 US/100 g si seulement 3h) (McFarren <i>et al.</i> 1965; Fernandez et Cembella 1995) • Probleme de spécificité si 24h dû à des AGPI (Tester et Fowler 1990) 	<ul style="list-style-type: none"> • Mesure de la toxicité globale basée sur la réponse biologique de l'animal. • Facile à mettre en œuvre. • Faible coût de l'analyse. 	<ul style="list-style-type: none"> • Considérations éthiques. • Méthode semi-quantitative. • Manque de spécificité (ne permet pas d'obtenir d'informations sur l'identité des toxines).

Type de méthode	Technique	Performances	Avantages	Inconvénients
Biocapteurs	<ul style="list-style-type: none"> • Réseaux de neurones • Résonance des plasmons de surface • Aptamères 	<ul style="list-style-type: none"> • LD de 11 µg BTX-3/L d'eau de mer (Kulagina <i>et al.</i> 2006), et LQ de 0,1 ng BTX-2/mL d'extrait de mollusques (Eissa <i>et al.</i> 2015). • Taux de récupération compris entre 102 et 107 % (Eissa <i>et al.</i> 2015). 	<ul style="list-style-type: none"> • Mise en œuvre rapide • Peu coûteux • Sensible • Pas de réactivité croisée avec l'acide okadaïque et les microcystines. 	<ul style="list-style-type: none"> • Non commercialisés • Développements limités à la BTX-2 et la BTX-3. • Spécificité limitée. • Ne permet pas de distinguer la BTX-2 de la BTX-3 (réactivité croisée)

2.4 Recommandations du GT pour les méthodes analytiques

Le GT recommande :

- de produire et de rendre disponible un plus grand nombre d'étalons et de matériaux de référence de brevétoxines et de leurs métabolites ;
- de développer des méthodes d'analyse physico-chimiques basées sur la spectrométrie de masse et permettant d'ajouter aux brevétoxines natives leurs métabolites les plus polaires, afin de pouvoir les prendre en compte lorsqu'ils sont présents dans les coquillages ;
- de mener des études de validation inter-laboratoires en bonne et due forme (AOAC ou ISO) afin d'apprécier la fiabilité des méthodes physico-chimiques, biochimiques et biologiques ;
- de rechercher prioritairement les brevétoxines suivantes par des méthodes basées sur la spectrométrie de masse : BTX-1, BTX-2, BTX-3, BTX-B1, BTX-B2, S-désoxy-BTX-B2, BTX-B3, BTX-B4(a et b).

3 Microalgues productrices de brevétoxines

Plusieurs organismes marins ont la capacité de produire des brevétoxines ou des métabolites dérivés. Ce sont des eucaryotes autrefois classés comme microalgues, qui appartiennent aujourd'hui au groupe des protistes photosynthétiques (autotrophes).

La classification phylogénétique représentée et mise à jour par Adl *et al.* (2019) illustre la diversité des protistes (autotrophes et hétérotrophes).

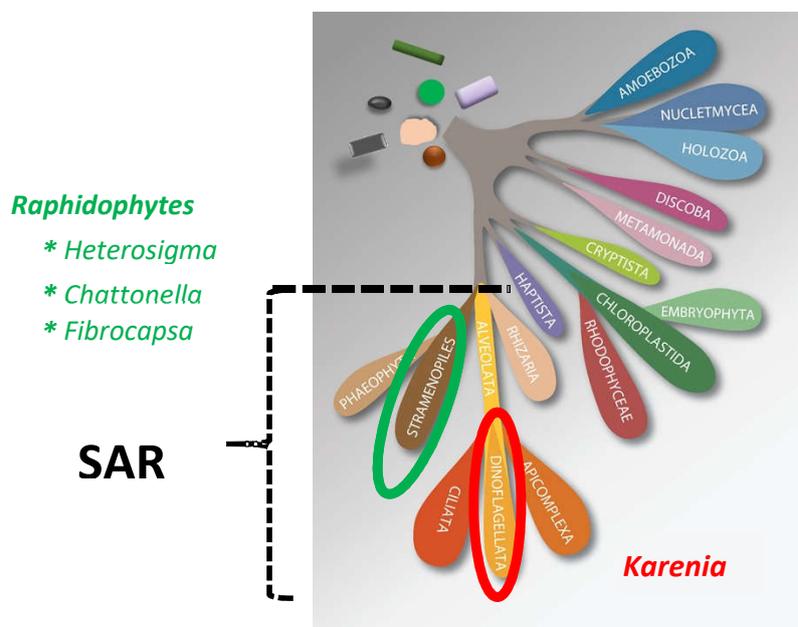


Figure 9 : Classification phylogénétique représentant la diversité des protistes parmi les eucaryotes (modifié d'après Adl *et al.* (2019)). SAR : Stramenopiles, Alveolata et Rhizaria

Les producteurs de brevétoxines et autres composés assimilés se rangent dans deux clades distincts :

- 1) le genre *Karenia*, anciennement *Gymnodinium*, qui appartient au clade des Dinoflagellés, constituant une partie des Alveolates (avec les ciliés et les Apicomplexes) ;
- 2) les genres *Chattonella*, *Heterosigma* et *Fibrocapsa* constituent le sous-groupe des Raphidophytes (Raphidophycées) qui font partie des Straménopiles.

Les Dinoflagellés et les Straménopiles sont tous deux rangés dans le super-groupe des SAR (Straménopiles, Alveolates et Rhizaria) et ont donc des caractéristiques structurales et métaboliques communes.

En l'état des connaissances, le lien formel entre microalgues et production de brevétoxines et/ou métabolites assimilés n'a été confirmé que pour *K. brevis*. Les toxines produites par cette espèce étant essentiellement intracellulaires (Roth *et al.* 2007; Rolton *et al.* 2015) dans le cytoplasme (Baden *et al.* 2005), celles-ci sont libérées dans l'environnement lors de la lyse cellulaire (occasionnée par des chocs mécaniques telles que les vagues et courants marins, ou à la fin de l'efflorescence).

3.1 Les dinoflagellés producteurs de brevétoxines et composés assimilés : le genre *Karenia*

La classification actuelle du genre *Karenia* est la suivante : Eukaryota; Sar; Alveolata; Dinophyceae; Gymnodiniales; Kareniaceae; Karenia (selon Adl *et al.* (2012) et NCBI international database).

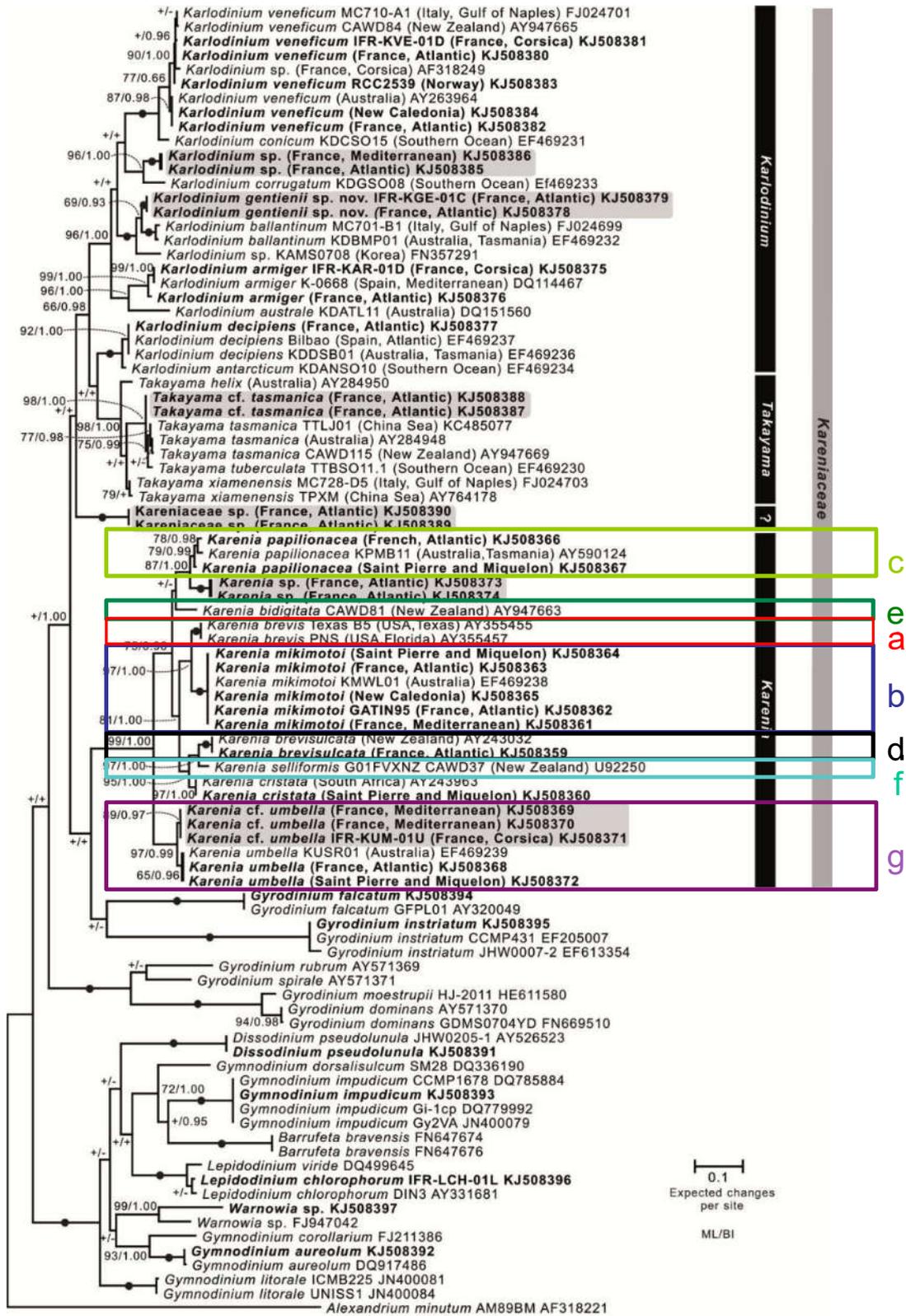


Figure 10 : Arbre phylogénétique construit à partir d'une région (D1-D2) de la LSU (large sous-unité) ribosomale par la méthode du Maximum Likelihood (ML) représentant l'ensemble du genre *Karenia* et des espèces associées en particulier a) *K. brevis*, b) *K. mikimotoi*, c) *K. papilionacea*, d) *K. brevisulcata*, e) *K. bicuneiformis*, f) *K. selliformis*, g) *K. umbella* (d'après Nézan et al. (2014)).

L'arbre ci-dessus (Figure 10) représente le superclade des *Kareniaceae*, qui se divise en 3 clades distincts dont celui des *Karenia* (1/100). Ce clade monophylétique regroupe les différentes espèces de *Karenia*, avec l'espèce *K. umbella* (g), plus éloignée phylogénétiquement que les espèces *K. brevisulcata* / *K. selliformis* (d/f), et *K. papilionaceae* (c); les espèces *K. brevis* (a) et *K. mikimotoi* (b) étant les plus proches comme le montrent les distances entre les 2 branches a et b.

Le genre *Karenia* (de la famille des *Kareniaceae*) comprend 12 espèces marines dans des zones océaniques et côtières. Seules les espèces à potentiel toxique, ou connues dans la littérature comme telles, sont traitées dans ce rapport. Parmi le genre *Karenia*, certaines espèces sont capables de proliférer et former des efflorescences denses qui entraînent des dysfonctionnements multiples de l'hydrosystème, mais également un fort potentiel toxique pour tous les organismes des réseaux trophiques. On parle alors de marée rouge (« *red tides* ») lorsque des proliférations massives sont visibles et colorent la surface de l'eau ou toute la colonne d'eau (Figure 11).



Figure 11 : Photos d'efflorescence de *Karenia brevis* ; en haut, le long de la côte Nord de Floride entre Destin et Panama City, prise d'un parachute ascensionnel ; en bas, sur la côte du Texas (NOAA)

■ Répartition géographique

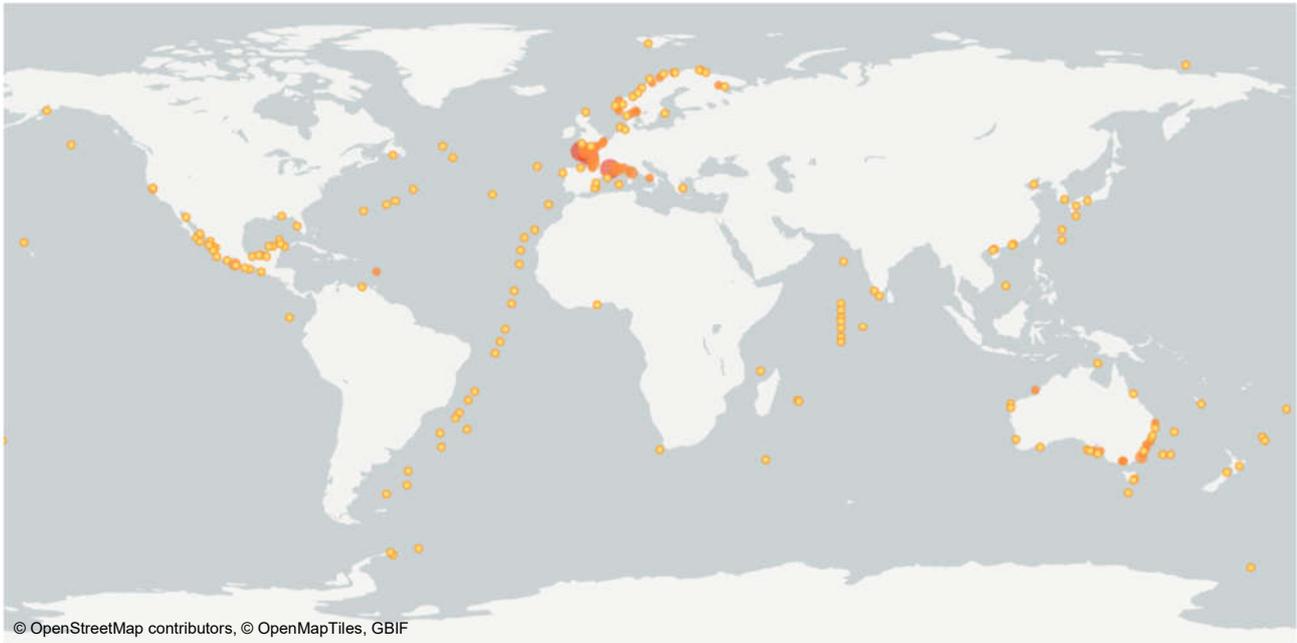


Figure 12 : Occurrence de *Karenia* spp. (d'après les données du GBIF en novembre 2020, détail en annexe 6)

Les espèces de *Karenia* sont des dinoflagellés sans thèque (i.e. nues ou non armées), munies de deux flagelles permettant leur mobilité. L'identification précise au microscope optique simple est rendue difficile par l'absence de thèque. L'utilisation de fixateur comme le lugol provoque le plus souvent des déformations.

3.1.1 *Karenia brevis* (Davis, 1948) G. Hansen et Moestrup, 2000

Pour la taxinomie se reporter à la Figure 10a.

Basionyme: *Gymnodinium breve* Davis 1948; synonyme: *Ptychodiscus brevis* (Davis) Steidinger 1979.

■ Morphologie et structure

Les cellules de *Karenia brevis* sont de taille moyenne (23–34 µm de long, 24–26 µm de large), très aplaties dorso-ventralement (10–15 µm de profondeur), avec une face dorsale convexe et une face ventrale concave. L'épicône est arrondi avec une protrusion apicale bulbeuse proéminente. L'hypocône est cranté et légèrement bilobé. Le cingulum est légèrement déplacé. Le sulcus s'étend dans l'épicône alors que le sillon apical s'étend légèrement sur le côté dorsal de l'épicône. Les chloroplastes sont généralement nombreux et de couleur jaune-vert. Le noyau sphérique est situé sur le côté gauche de l'hypocône. La rainure apicale s'étend un peu sur l'épicône dorsale (Lassus *et al.* 2016).

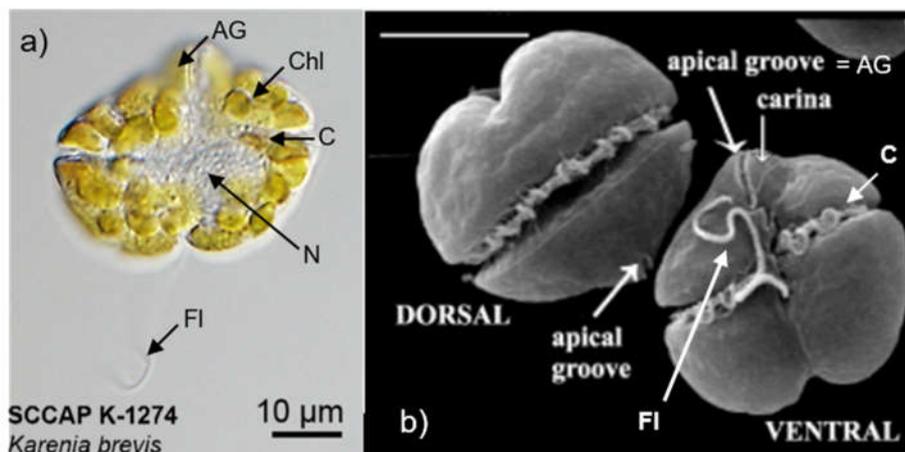


Figure 13 : Cellules de *Karenia brevis* a) en microscopie photonique (photo de Gert Hansen, (<http://nordicmicroalgae.org>) et b) en microscopie électronique à balayage (MEB) (d'après Haywood *et al.* (2004)). AG : Apical groove (sillon apical), C : cingulum, Chl : chloroplastes, FI : flagelle, N : noyau. Echelle : 10 µm

■ Cycle de vie

Comme la plupart des espèces appartenant au groupe des dinoflagellés, *K. brevis* présente un cycle de vie composée de deux phases (Brand *et al.* 2012). Une phase privilégiée de multiplication asexuée qui se produit généralement la nuit et sous contrôle d'une « horloge biologique » (Van Dolah *et al.* 2009). La deuxième phase (reproduction sexuée) a été observée uniquement en culture avec la formation de gamètes et de planozygotes. Cette observation a été décrite en situation de stress : nutritionnel, thermique, salin ou de densité (Densité de Flux Photonique Photosynthétique). Cette reproduction sexuée est supposée aboutir à la formation de kystes qui sont la forme de résistance (banque de kystes) qui joue un rôle dans l'initiation des efflorescences (Kang 2010).

■ Production de métabolites / toxines

Cette espèce est décrite depuis plusieurs décennies comme productrice de **brevétoxines**, de **brévisamide**, de **brévisine**, de **brévénal**, d'**hémolysines**, etc. (Brand *et al.* 2012). (Voir le Tableau 3 dans la section 2.2 pour plus de détail). En laboratoire, la quantité moyenne de brevétoxines (BTX-1, BTX-2 et BTX-3 analysées par HPLC/UV) produite par cellule de *K. brevis* est comprise entre 8 et 30 pg par cellule (Baden et Tomas 1988 ; Pierce *et al.* 2000).

■ Influence des facteurs environnementaux sur la croissance et la production de toxines

○ Rôle de la température et de la salinité

Ces deux facteurs environnementaux sont connus pour être de forts déterminants de la distribution des microalgues. Ainsi, la distribution spatio-temporelle des organismes dépend entre autres de leur capacité d'acclimatation aux variations de ces deux paramètres.

De nombreuses études ont cherché à mettre en évidence l'influence de la température et de la salinité. Ainsi, *K. brevis* peut se développer sur une plage étendue de températures comprises entre 7 et 33°C mais son optimum selon les clones se situe entre 22 et 28°C (Brand *et al.* 2012). Les taux de croissance sont clone-dépendant. ils varient entre environ 0,2 et 0,3 d⁻¹ (Errera *et al.* 2010; Bercel et Kranz 2019). Ce taux peut descendre à 0,1 d⁻¹ (Corcoran *et al.* 2014) en cas de stress en nutriment. Comme classiquement observé, la tolérance à ces variations de température est dépendante des souches étudiées. Cette plasticité thermique à la température explique sa capacité à former des efflorescences dans des conditions très contrastées dans les écosystèmes côtiers. La salinité est aussi un paramètre important pour le développement d'efflorescence de *K. brevis*. Ainsi il a été montré que cette espèce a un optimum compris entre 30 et 34 (gamme comprise entre 18 et 45) (Brand *et al.* 2012) mais qu'elle ne se développe pas au faible salinité, < 24 (Brand *et al.* 2012) ou < 17,5 (Brown *et al.* 2006)). Cette influence de la salinité peut expliquer la présence majoritaire des efflorescences en milieu côtier mais faiblement en milieu estuarien. Deux études ont montré l'influence du stress salin (NaCl) sur l'augmentation de la production de BTX (Errera *et al.* 2010; Errera et Campbell 2011). Cependant l'étude de Sunda *et al.* (2013) a infirmé ces observations sur les mêmes clones étudiés.

○ Rôle des nutriments

Plusieurs études ont montré que *K. brevis* pouvait rechercher sa source d'azote sous de nombreuses formes. Ainsi, Brand *et al.* (2012) ont montré que des clones de *K. brevis* utilisent les nitrates, les nitrites, l'ammonium mais aussi l'urée et de la matière organique même si l'ammonium semble être la forme d'azote privilégiée, confirmant son caractère mixotrophe.

○ Rôle des facteurs environnementaux sur la production de toxines

De nombreuses études ont cherché à démontrer un impact de ces facteurs sur la production de toxines. Lekan et Tomas (2010) ont montré que le stress en nutriments n'avait pas d'impact sur cette production de toxines contrairement à la concentration en pression partielle en CO₂ dans l'eau qui pourrait l'augmenter (Errera *et al.* 2014). Néanmoins, Hardison *et al.* (2013) ont montré qu'un stress en phosphore pouvait impacter la taille des cellules et augmenter temporairement la concentration des toxines dissoutes dans l'eau après lyse cellulaire. Par ailleurs, deux études ont mis en évidence que plusieurs espèces compétitrices du phytoplancton en co-culture avec *K. brevis* pouvaient métaboliser les BTX dissoutes dans l'eau (de 40 à 70% de la quantité mesurée de BTX sous forme libre) (Derby *et al.* 2003; Myers *et al.* 2008). Myers *et al.* (2008) ont montré que des espèces de diatomées, de cryptophytes et d'autres dinoflagellés exposées à des BTX dissoutes (sans cellule de *Karenia*) pouvaient les biotransformer et réduire ainsi la dynamique des BTX lors d'efflorescences. Il semble que ces divers facteurs influencent à plusieurs niveaux l'intensité la durée des efflorescences et donc indirectement l'impact toxique des efflorescences.

■ Répartition géographique

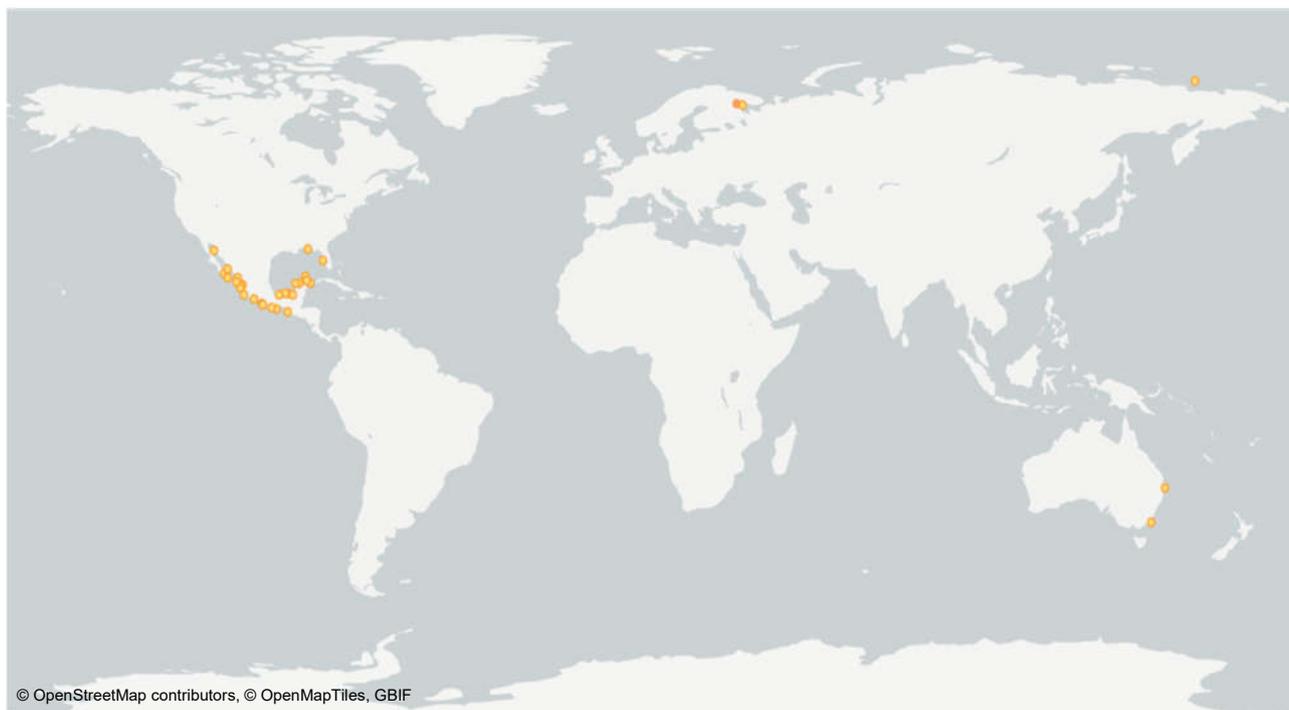


Figure 14 : Occurrence de *Karenia brevis* (d'après les données du GBIF en novembre 2020, détail en annexe 6). *Karenia brevis* n'est pas une espèce existante dans GBIF. Cette carte a donc été créée en faisant un filtre « *Karenia brevis* » sur la propriété « verbatim scientific name ». La représentativité est probablement sous-estimée.

Au niveau mondial, il apparaît que l'abondance et la persistance des efflorescences de *K. brevis* augmentent depuis plusieurs années (Flewelling *et al.* 2005; Brand & Compton 2007), notamment dans le golfe du Mexique. Pour exemple, les données recueillies le long de la côte du Sud-Ouest de la Floride entre la baie de Tampa et l'île Sanibel, montrent que *K. brevis* est environ 13 à 18 fois plus abondante entre 1994-2002 qu'entre 1954-1963. En outre, il s'avère que *K. brevis* est environ 20 fois plus abondante à moins de 5 km du rivage qu'à 20-30 km au large (Brand & Compton 2007).

Cependant, une étude plus récente exploitant les bases de données HAEDAT⁵ et OBIS⁶ sur une période de 30 ans n'a pas permis de confirmer la tendance à la hausse des efflorescences sur la côte US du golfe du Mexique (Anderson *et al.* 2021).

Les efflorescences de *K. brevis* peuvent être peu étendues, présenter de faibles concentrations (< 1000 cell.L⁻¹) et ne persister que quelques jours ou semaines mais elles peuvent également s'étendre sur de grandes surface (6000 km²) et persister plus de 18 mois (Tester *et al.* 1997 ; Patel *et al.* 2020).

En 2005, une prolifération de *K. brevis* a persisté durant plus de 20 mois au large de l'Ouest de la Floride et semble avoir été alimentée par l'apport de nutriments exogènes puis soutenue par des nutriments recyclés (Brand & Compton 2007; Heisler *et al.* 2008). Il semble que les efflorescences de *K. brevis* sur le plateau de l'Ouest de la Floride se retrouvent plutôt dans des eaux contenant des rapports N/P inorganiques dissous faibles (Heisler *et al.* 2008).

K. brevis n'a pas été trouvée en France (plus de détail dans la partie 7.4.1).

3.1.2 *Karenia mikimotoi* (Miyake & Kominami ex Oda) Gert Hansen & Moestrup 2000

Pour la taxinomie se reporter à la Figure 10b.

De la famille des *Kareniaceae*, *K. mikimotoi* a un historique de classification complexe, avec plusieurs noms liés aux auteurs, dates et lieux de découverte. Initialement identifiée par Oda (1935) sous le terme *Gymnodinium mikimotoi* (homotype) les autres synonymes de l'espèce ont été : *Gymnodinium nagasakiense*, *Gyrodinium aureolum* pour finalement appartenir au genre *Karenia* (Daugbjerg *et al.* 2000).

■ Morphologie et structure

Les cellules de *K. mikimotoi* ont des dimensions comprises entre 25-35 µm de long et 14-35 µm de large, ovales à arrondies, comprimées dorso-ventralement. L'épicône est plus rond et petit que l'hypocône souvent légèrement bilobé. Un long sillon droit en position apicale, étendu du côté ventral jusqu'au côté dorsal de l'épicône croise sur la droite le sulcus, au milieu de la surface ventrale. Les flagelles se localisent dans le cingulum et le sulcus; le flagelle longitudinal étant plus long que la cellule entière. Le noyau ellipsoïdal se trouve sur le côté centre gauche de l'hypothèque. Le cytoplasme contient 10 à 20 chloroplastes ovales à ronds, de couleur marron-jaunes, contenant chacun un pyrénoloïde (Takayama et Adachi 1984; Fukuyo *et al.* 1990). *K. mikimotoi* possède les mêmes pigments du genre *Karenia* : Chlorophylle a et c, fucoxanthine et dérivés ainsi que la gyroxanthine et peu ou pas de péridine, d'ordinaire caractéristique des dinoflagellés.

⁵ HAEDAT : Harmful Algal Event Database

⁶ OBIS : Ocean biodiversity information system

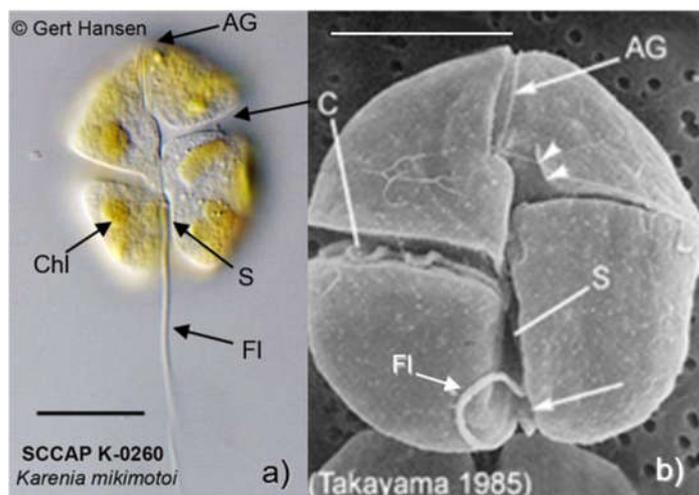


Figure 15 : Cellules de *K. mikimotoi* a) photo de Gert Hansen, (<http://nordicmicroalgae.org>); b) à droite, en microscopie électronique à balayage (MEB) (d'après Takayama (1985)) révélant le sillon apical sur la partie dorsale de l'apicône (AG): C : cingulum, Chl : chloroplastes, Fl : flagelle, N : noyau, S : sulcus. Echelle: 10 μm

■ Cycle de vie

La reproduction asexuée est majoritaire par fission binaire, et une forme sexuée (par conjugaison) reste minoritaire dans le cycle de vie de *K. mikimotoi*. La formation de kystes temporaires (forme de résistance) s'enclenche lorsque les sources en azote (N) sont défavorables (Zhao *et al.* 2017). Les kystes sont ronds et plus larges que les cellules végétatives, restant en latence au fond des sédiments.

■ Production de métabolites / toxines

Des substances hémolytiques et ichthyotoxiques ont été détectées au sein des cellules, telles que les gymnocines A et B (Satake *et al.* 2002; Satake *et al.* 2005) et la production d'acides gras polyinsaturés (Mooney *et al.* 2007). La production de brevététoxine, mentionnée par Haywood *et al.* (2007) n'a jamais été confirmée depuis. La production d'acides gras polyinsaturés (Mooney *et al.* 2007) dont l'acide gras octadécapentaénoïque et un triglycéride (activité hémolytique) ont pu être identifiés par Yasumoto (1989). Une forte capacité cytotoxique, liée en partie à une forte production d'espèces réactives de l'oxygène est suspectée, responsable de nombreux dommages cellulaires (Brand *et al.* 2012; Li *et al.* 2019).

■ Facteurs influençant l'apparition d'efflorescence

Bien qu'eurytherme, les efflorescences de *K. mikimotoi* s'observent entre 13 et 22°C et sont corrélées à une élévation de température (Mahoney *et al.* 1990; Honjo *et al.* 1991), à un ratio de N/P proche de 16/1 (Li, 2017), et une concentration en fer non négligeable sous forme de FePO₄ et FeS (Naito *et al.* 2005). La stratégie adaptative de migration verticale diurne (jusqu'à 20 m) lorsque la stratification est faible (sinon *K. mikimotoi* reste dans la pycnocline) et sa rapidité de déplacement dans la colonne d'eau (vélocité de 2,2 m/s (Koizumi *et al.* 1996)) lui confèrent un net avantage sur les autres espèces du phytoplancton et lui permettent de proliférer massivement à la surface dans la journée (Li *et al.* 2019).

Bien que ces mêmes facteurs abiotiques (température, eutrophie, salinité) puissent influencer la production de toxines (Li *et al.* 2019), aucune étude écophysiological n'a pu confirmer leur incidence effective sur la quantité de toxines dans les cultures. Seuls Zhao *et al.* (2017) ont reporté un changement de toxicité (ichthyotoxicité liés aux acides gras) en fonction du milieu de culture lié à la source en azote (l'urée induisait des acides gras à courte chaîne ; alors que le NH₄ induisait une augmentation d'acides gras à longue chaîne).

■ Répartition géographique

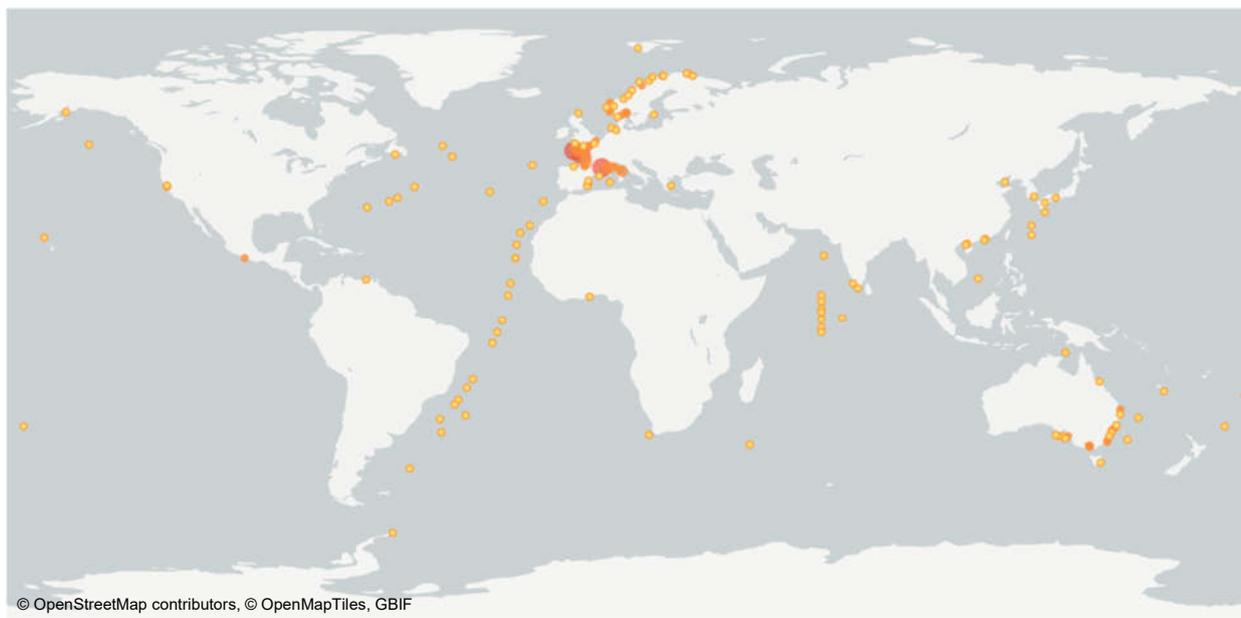


Figure 16 : Occurrence de *Karenia mikimotoi* (d'après les données du GBIF en novembre 2020, détail en annexe 6)

K. mikimotoi est souvent trouvée en France (plus de détails dans la partie 7.4.1).

3.1.3 *Karenia papilionacea* A.J.Haywood & K.A.Steidinger 2004

Pour la taxinomie se reporter à la Figure 10c.

■ Morphologie et structure

Les cellules peuvent être de forme et de taille variées, entre 18-32 µm de long et 18-48 µm de large, aplaties dorso-ventralement et plus ou moins elliptiques. Elles présentent une forme en dôme de l'épicône, alors que l'hypocône est bilobé, le lobe droit plus court que le gauche excavé. Le sulcus déborde sur l'épicône. Le sillon apical s'étend dorsalement sur le tiers de l'épicône (Haywood *et al.* 2004). Le noyau est de forme sphérique à légèrement ovale, situé dans la partie gauche de l'hypocône. Les chloroplastes sont plus ou moins nombreux et de couleur vert-jaune.

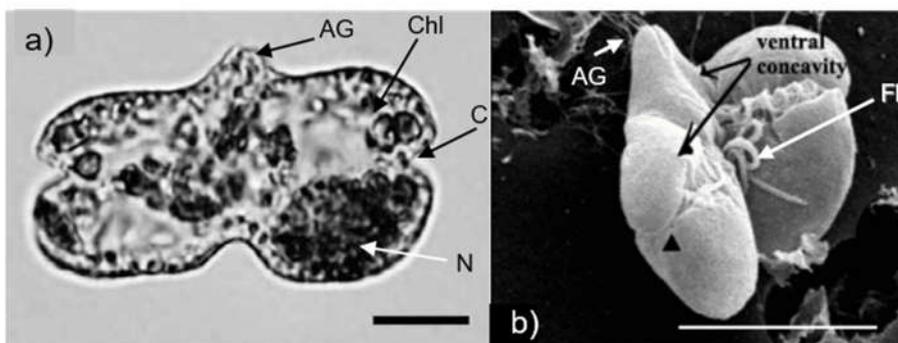


Figure 17 : Cellules de *K. papilionacea* a) Microphotographies photoniques en vue ventrale cellules fixées au Lugol (d'après Lassus *et al.* (2016)) et b) en microscopie électronique à balayage (d'après Haywood *et al.* (2004)). AG : sillon apical, C : cingulum, Chl : chloroplastes, FI : flagelle, N : noyau. Echelle : 10 µm

■ Cycle de vie

Il y a très peu d'études jusqu'à présent sur cette espèce. On peut supposer que *K. papilionacea* comme les autres dinoflagellés possède un cycle de vie composé de deux phases (asexuée et sexuée).

■ Production de métabolites/toxines

Peu d'étude sont disponibles pour cette espèce. Cependant, la production de composés ichtyotoxiques comme les stérols ou lipides est avérée, comme pour d'autres espèces de *Karenia* (Brand *et al.* 2012). Par ailleurs, il a été clairement établi qu'une culture en laboratoire de *K. papilionacea* initialement trouvée BTX positive par un test ELISA (Naar *et al.* 2002; Haywood *et al.* 2004) a été confirmée **productrice de BTX-2** par UPLC/HRMS et RMN (Fowler *et al.* 2015).

■ Influence des facteurs environnementaux sur la croissance et la production de toxines

Il n'existe pas d'étude spécifique sur cette espèce permettant d'évaluer concrètement l'impact de ces facteurs. Une seule étude (Fowler *et al.* 2015) a montré qu'après un choc osmotique (hypoosmotique), la production de toxine (BTX-2) était 2 à 3 fois plus élevée. Cette étude écophysiologique corrobore d'autres études précédemment réalisées sur *K. brevis* (Errera et Campbell 2011) qui révèlent une augmentation de la concentration intracellulaire de BTX au cours d'un stress osmotique (réduction de salinité de 35 à 27).

■ Répartition géographique



Figure 18 : Occurrence des *Karenia papilionacea* (d'après les données du GBIF en novembre 2020, détail en annexe 6).

[NB : Ces données sont probablement sous estimées, et n'incluent pas les données du REPHY (voir partie 7.4.1). D'après les experts (symboles carrés), l'espèce a été identifiée aux USA, en Europe et en particulier en France, en Nouvelle Zélande, en Australie, en Asie.]

K. papilionacea est souvent retrouvée en France (plus de détails dans la partie 7.4.1).

3.1.4 *Karenia brevisulcata* (F.H.Chang) Gert Hansen & Moestrup 2000

Pour la taxinomie se reporter à la Figure 10d.

Basionyme de cette espèce : *Gymnodinium brevisulcatum* (F.H. Chang, 1999)

■ Morphologie et structure

Cette espèce a une taille comprise entre 13 et 25 µm de longueur pour 10 à 25 µm de largeur. Les cellules sont aplaties dorso-ventralement. Le sulcus est peu étendu dans l'épicône. Le sillon apical est court et épais, s'étendant dorsalement sur le tiers de l'épicône (Hoe Chang 1999). Le noyau a une forme sphérique à faiblement allongé situé dans l'hypocône. Les chloroplastes sont plus ou moins nombreux, de couleur vert-jaune et généralement allongés.

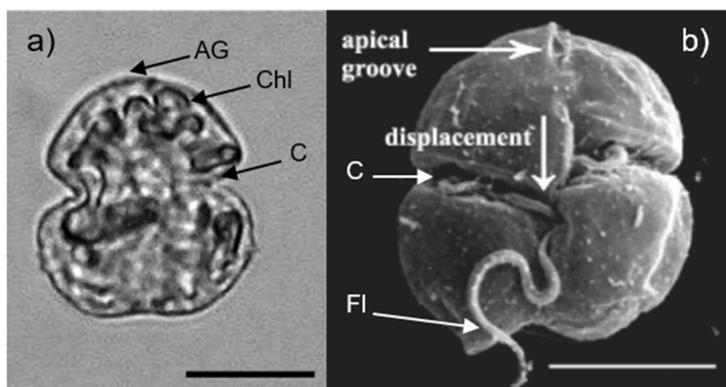


Figure 19 : Cellules de *Karenia brevisulcata* a) en microscopie photonique (d'après Lassus *et al.* (2016) et b) en microscopie électronique à balayage (d'après Haywood *et al.* (2004)). AG : sillon apical, C : cingulum, Chl : chloroplastes, Fl : flagelle, N : noyau. Echelle: 10 µm

■ Cycle de vie

Il y a très peu d'études jusqu'à présent sur cette espèce. On peut supposer que *K. brevisulcata* comme les autres dinoflagellés possède un cycle de vie composé de deux phases (asexuée et sexuée).

■ Production de métabolites/toxines

Plusieurs toxines comme les brévisulcénals (Satake *et al.* 2018) et les acides brévisulcatiques ont été mis en évidence (Holland *et al.* 2012; Suzuki *et al.* 2014; Irie *et al.* 2016).

■ Influence des facteurs environnementaux sur la croissance et la production de toxines

Il n'y a pas d'étude spécifique sur cette espèce à ce jour dans la littérature.

■ Répartition géographique



Figure 20 : Occurrence de *Karenia brevisulcata* (d'après les données du GBIF en novembre 2020, détail en annexe 6). [NB : D'après les experts (symboles carrés), l'espèce a également été identifiée en Nouvelle Zélande (Haywood *et al.* 2004) et en France (INPN, 2017⁷)]

⁷ Occurrence renseignée dans la base de donnée de l'Inventaire National du Patrimoine Naturel : https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/647558

K. brevisulcata a été détectée en France (plus de détails dans la partie 7.4.1).

3.1.5 *Karenia bicuneiformis* Botes, Sym & Pitcher 2003

Pour la taxinomie se reporter à la Figure 10e.

Synonyme (non validé) de *Karenia bidigitata* Haywood & Steidinger 2004

■ Morphologie et structure

Karenia bicuneiformis a une taille comprise entre 16 et 35 µm de longueur et 18 à 40 µm de largeur. La cellule est aplatie dorso-ventralement, avec une épïcône conique et un hypocône en forme de W. Le sulcus s'étend dans l'épïcône, tandis que le sillon apical s'étend légèrement sur la partie dorsale de l'épïcône (Botes *et al.* 2003).

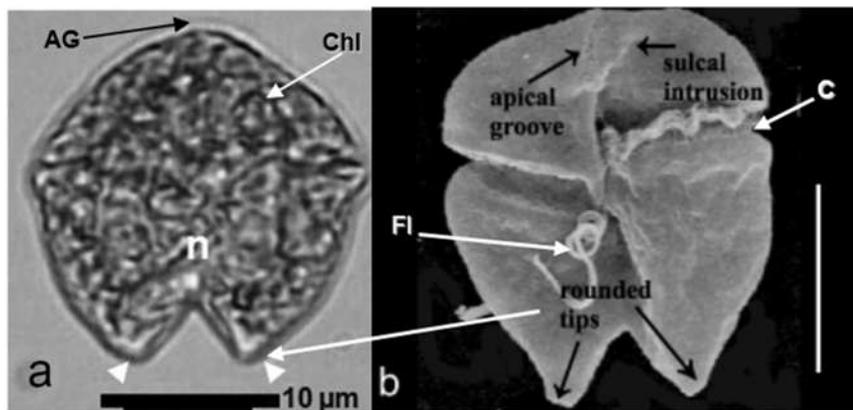


Figure 21 : Cellules de *Karenia bicuneiformis* a) en microscopie photonique (Escobar-Morales et Hernández-Becerril 2015) et b) en microscopie électronique à balayage d'après Haywood *et al.* (2004). AG : sillon apical, C : cingulum, FI : flagelle, N : noyau. Echelle : 10 µm.

■ Cycle de vie

Il y a très peu d'études jusqu'à présent sur cette espèce. On peut supposer que *K. bicuneiformis* comme les autres dinoflagellés possède un cycle de vie composé de deux phases (asexuée et sexuée).

■ Production de métabolites/toxines

Seule une souche cultivée en laboratoire, originaire d'Afrique du Sud (False Bay) a produit des **BTX, détectées par un test ELISA** (Botes *et al.* 2003; Moestrup *et al.* 2009). Aucune étude n'a confirmé des effets toxiques *in situ* sur la faune sauvage ni sur l'Homme.

■ Influence des facteurs environnementaux sur la croissance et la production de toxines

Il n'y a pas d'étude spécifique sur cette espèce à ce jour dans la littérature.

■ Répartition géographique



Figure 22 : Occurrence de *Karenia bicuneiformis* (d'après les données du GBIF en novembre 2020, détail en annexe 6).

[NB : d'après les experts (symbole carré), l'espèce a été également identifiée en Nouvelle-Zélande et sur les côtes pacifiques du Mexique (Haywood *et al.* 2004; Maciel-Baltazar et Hernández-Becerril 2013).

Note : *Karenia bicuneiformis* n'est pas une espèce existante dans la base de données, la carte présente les données filtrées « *Karenia bicuneiformis* » sur la propriété « *verbatim scientific name* ».

K. bicuneiformis n'a pas été retrouvée en France (plus de détail dans la partie 7.4.1).

3.1.6 *Karenia selliformis*

Pour la taxinomie se reporter à la Figure 10f.

■ Morphologie et structure

Cette espèce a une taille comprise entre 20 et 27 μm de longueur pour 16 à 24 μm de largeur. Les cellules sont aplaties dorso-ventralement et de forme ovale. L'épicône est légèrement conique et plus petit que l'hypocône, qui est bilobé (flèches). Le sulcus s'étend sur l'épicône, alors que le sillon apical s'étend dorsalement sur le tiers de l'épicône (Haywood *et al.* 2004). Le noyau, de forme ovale à elliptique, se situe au centre de l'hypocône. Les chloroplastes, de couleur vert-jaune, se localisent généralement à la périphérie de la cellule.

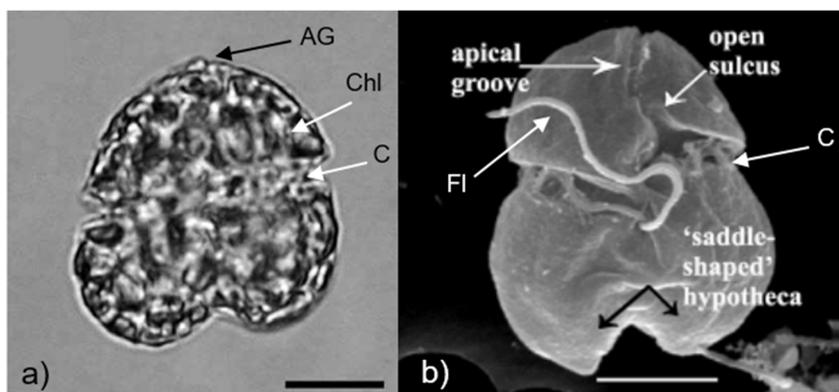


Figure 23 : Cellules de *Karenia selliformis* a) en microscopie photonique (d'après Lassus *et al.* (2016)) et b) en microscopie électronique à balayage (d'après Haywood *et al.* (2004)) . AG : sillon apical, C : cingulum, FI: flagelle, N : noyau Echelle : 10 μm

■ Cycle de vie

Il y a très peu d'études jusqu'à présent sur cette espèce. On peut supposer que *K. selliformis* comme les autres dinoflagellés possède un cycle de vie composé de deux phases (asexuée et sexuée).

■ Production de métabolites/toxines

Peu d'études sont disponibles pour cette espèce. Cependant il a été montré comme pour d'autres espèces de *Karenia*, la production de composés ichtyotoxiques (Brand *et al.* 2012). Par ailleurs, il a été clairement établi que *K. selliformis* produit des gymnodimines (Medhioub *et al.* 2009). La gymnodimine A et la C (isomère de la B) ont été mises en évidence (Miles *et al.* 2000, 2003).

■ Influence des facteurs environnementaux sur la croissance et la production de toxines

Il existe quelques études spécifiques sur cette espèce permettant d'évaluer l'impact de ces facteurs. Ainsi, Feki-Sahnoun *et al.* (2020) ont montré que cette espèce nécessite des salinités élevées (> 42,5) et des températures de l'air > 30°C et de l'eau > 29°C pour former des efflorescences dans la lagune de Boughrara (Tunisie). De même, Feki *et al.* (2013) ont montré une influence positive de la température, de la salinité et des nitrates sur la formation d'efflorescences de *K. selliformis* et une influence négative du phosphore total sur cette même formation d'efflorescences dans le golfe de Gabes (Tunisie).

■ Répartition géographique



© OpenStreetMap contributors, © OpenMapTiles, GBIF

Figure 24 : Occurrence des *Karenia selliformis* (d'après les données du GBIF en novembre 2020, détail en annexe 6).

[NB : D'après les experts (symbole carré), l'espèce a également été identifiée en Europe (Brand *et al.* 2012), en Afrique (Tunisie) et au Koweït (Haywood *et al.* 2004).]

K. selliformis n'a pas été retrouvée en France (plus de détail dans la partie 7.4.1).

3.1.7 *Karenia umbella* Salas, Bolch & Hallegraeff 2004

Synonyme (accepté mais non validé): *Karenia longicanalis* Z.B. Wang, I.J. Hodgkiss & Gerd Hansen. Wang *et al.* (2018) a décrit *K. umbella* comme étant *K. longicanalis*.

Pour la taxinomie se reporter à la Figure 10g.

■ Morphologie et structure

Cette espèce a une taille comprise entre 17,5 et 42 µm de longueur pour 10 à 32 µm de largeur. Les cellules sont ovales et légèrement aplaties dorso-ventralement. L'épicône est de forme conique avec 8 sillons rayonnants. L'hypocône possède un lobe droit plus long que le gauche, lui donnant un

aspect asymétrique. Le sulcus s'étend dans l'épicône et le large sillon apical s'étend dorsalement sur la moitié de l'épicône (De Salas *et al.* 2004). Le noyau de forme ronde à elliptique se situe au centre de l'hypocône. Les chloroplastes se localisent à la périphérie de la cellule, de manière irrégulière.

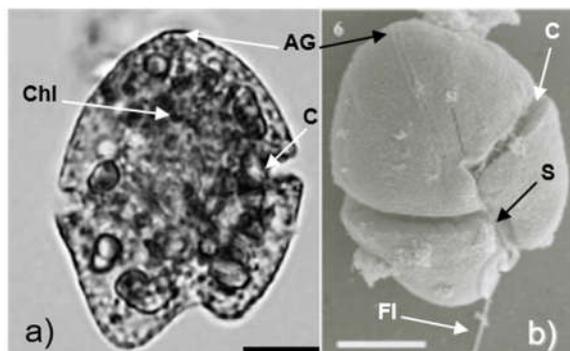


Figure 25 : Cellules de *Karenia umbella* a) en microscopie photonique (d'après Lassus *et al.* (2016)) et b) en microscopie électronique à balayage (d'après De Salas *et al.* (2004)). AG : sillon apical, C : cingulum, Fl : flagelle, N : noyau. Echelle : 10 µm.

■ Cycle de vie

Il y a très peu d'études jusqu'à présent sur cette espèce. On peut supposer que *K. umbella* comme les autres dinoflagellés possède un cycle de vie composé de deux phases (asexuée et sexuée).

■ Production de métabolites/toxines

Des épisodes ichtyotoxiques ont été rapportés liés à la présence de cette espèce en Tasmanie en 1989 et 2003 avec des mortalités de salmonidés (De Salas *et al.* 2004). Aucune analyse de toxine n'a été réalisée pour confirmer les substances en cause.

■ Influence des facteurs environnementaux sur la croissance et la production de toxines

Il n'y a pas d'étude spécifique sur cette espèce à ce jour dans la littérature.

■ Répartition géographique

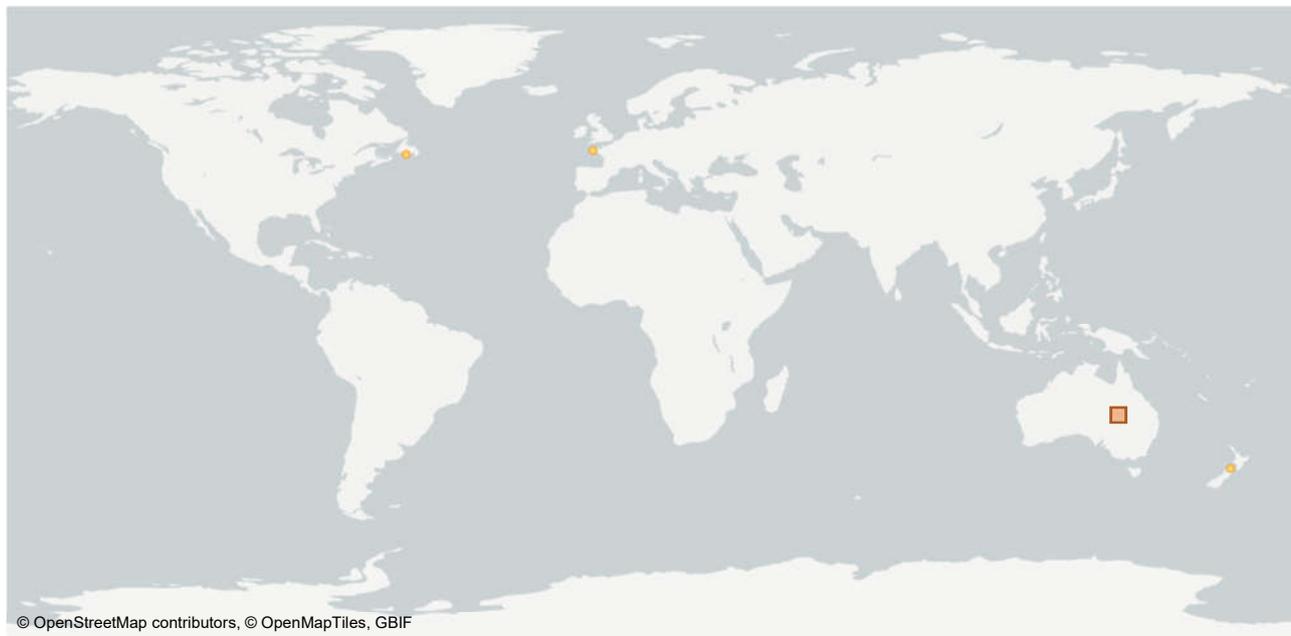


Figure 26 : Occurrence de *Karenia umbella* (d'après les données du GBIF en novembre 2020, détail en annexe 6).

[NB : D'après les experts (symbole carré), l'espèce a également été identifiée en Australie (De Salas *et al.* 2004).]

K. umbella a été retrouvée en France (plus de détail dans la partie 7.4.1).

3.2 Les Raphidophytes

Eucaryotes du super groupe des SAR (Straménopiles, Alvéolates, Rizaria) de la lignée des Straménopiles, Ochrophytes, de la catégorie des Raphidophyceae Chattonellales de la famille des Chattonellaceae (Figure 9).

Les Raphidophyceae (ou Raphidophyta) sont des protistes unicellulaires flagellés représentant 10 genres dont 7 vivent en milieux marins ou eaux saumâtres : **Chattonella**, **Chlorinimonas**, **Fibrocapsa**, **Haramonas**, **Heterosigma**, **Psammamonas**, et **Viridilobus**.

Les 3 genres potentiellement producteurs de brevétoxines et autres composés assimilés (i.e **Chattonella**, **Fibrocapsa**, **Heterosigma**) appartiennent à la famille des Chattonellales, et au sous-clade des *Vacuolariaceae* (Adl *et al.* 2012; Adl *et al.* 2019). Actuellement aucune étude n'a pu confirmer la production effective de BTX par ces espèces (par exemple par RMN), ni même de toxicité humaine avérée. Néanmoins, les Raphidophytes présentent des effets ichthyotoxiques sévères à létales (Lassus *et al.* 2016), dont la majorité des composés restent à identifier.

La position phylogénétique des 3 espèces d'intérêt, *Chattonella* spp. (Figure 27a), *Heterosigma akashiwo* (Figure 27b), et *Fibrocapsa japonica* (Figure 27c), est représentée ci-dessous selon Engesmo *et al.* (2016). Un clade monophylétique est représenté par les espèces de *Raphidophyceae* (1/100/100) clairement distinct des autres Ochrophytes (Figure 27). Au sein de ce clade, *Fibrocapsa japonica* tient une position basale, suivie de *Haramonas* (1/100/100). Les souches des 2 espèces d'*Heterosigma* (*H. akashiwo* & *H. minor*) sont quasiment identiques génétiquement, peu éloignées du groupe des *Chattonella* (1/83/81). Aucune divergence (18S, D1-D2 du 28S) n'est à noter entre *C. marina* / *C. marina var ovata*, *var antiqua* et *C. minima* (Figure 27a).

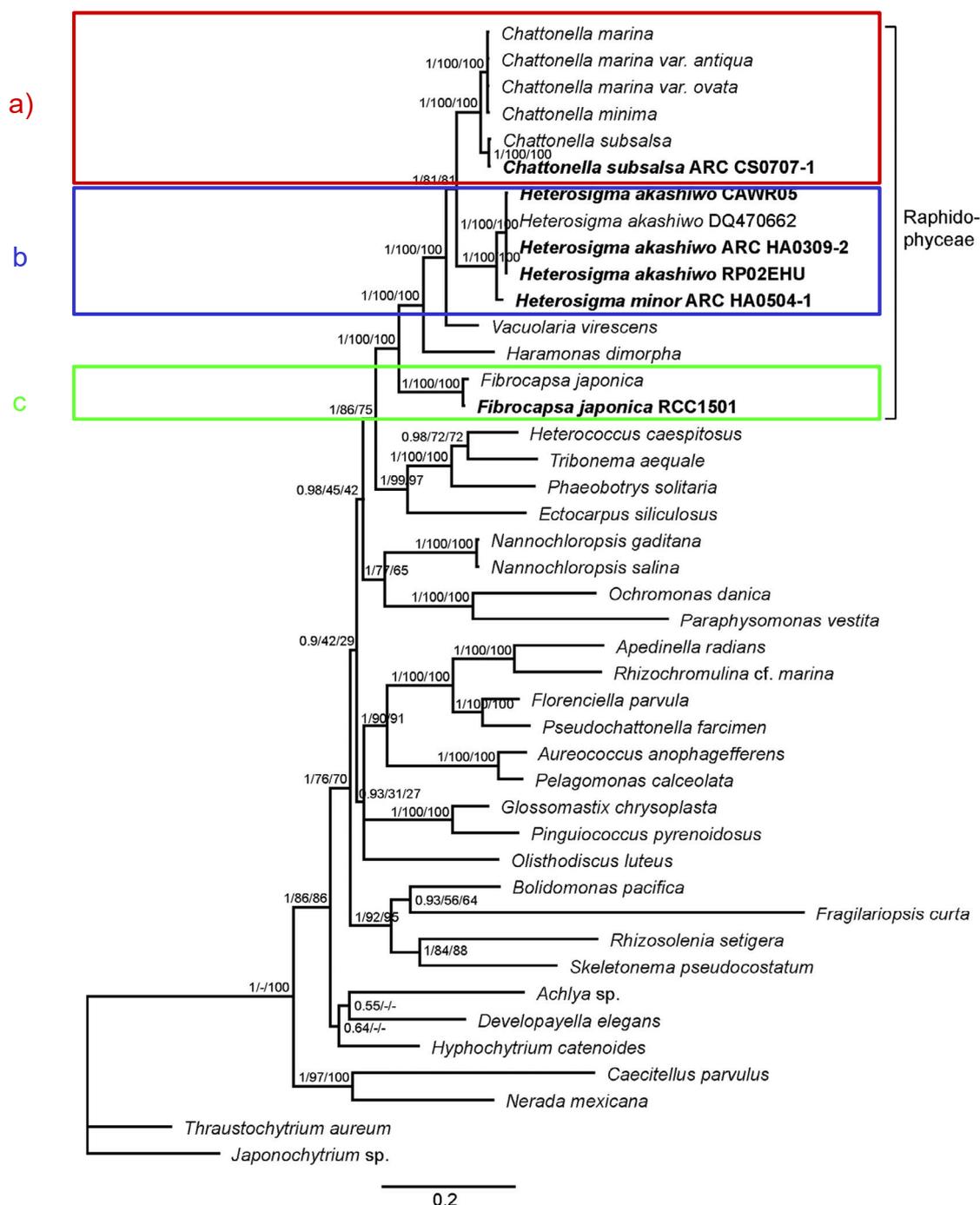


Figure 27 : Arbre phylogénétique (MrBayes) représentant les trois espèces potentiellement toxiques de *Raphidophyceae*, au sein du groupe des *Ochrophyta*. Concaténation des gènes 28S et des régions D1-D2 du 28S rDNA (3271 nt). Hétérochontes (Oomycètes) comme outgroup, d'après Engesmo et al. (2016).

Les cellules sans paroi sont très délicates et la préservation est insuffisante avec les méthodes standards (fixation au Lugol). L'identification ne peut se faire que sur des cellules non fixées.

3.2.1 *Heterosigma akashiwo* Hara et Chihara 1987

Pour la taxinomie se reporter à la Figure 27b.

De la famille des *Chattonellaceae*, le genre *Heterosigma* possède peu d'espèces, dont *H. akashiwo*, et très récemment l'espèce *H. minor* (Engesmo et al. 2016).

Les synonymes de *H. akashiwo* : *Olisthodiscus carterae*, *Entomosigma carterae*, ou encore d'autres noms lui ont été donnés, définissant la même espèce : *Heterosigma carterae* & *H. inlandica*.

■ Morphologie et structure

La forme des cellules est très variable, ovoïde, sphérique ou elliptique (pléiomorphique), possédant deux flagelles insérés dans un sillon sub-apical ou latéral oblique. La taille varie de 8 à 25 µm de long et 8-13 µm de large. Le noyau est central et les chloroplastes sont petits et nombreux à travers toute la cellule, entre 3 et 40 avec une moyenne de 25/cellule. De couleur vert sombre à marron, la cellule possède plusieurs pigments tels que la chlorophylle a, c1 et c2, la fucoxanthine et des β-carotènes.



Figure 28 : Illustration de *H. akashiwo* (à gauche, schéma d'après Tomas (1997)) ; au milieu, photo en microscopie photonique, (Cellule vivante ©J. Larsen) ; à droite : cellules lugolées d'après Nézan et al. (2014)).

■ Cycle de vie

Le cycle de vie des Raphidophytes est assez complexe et encore peu étudié. La reproduction asexuée dominante dans le cycle s'effectue par fission binaire (phase diploïde). Néanmoins, *H. akashiwo* a la capacité à produire une phase de latence (ou résistance) sous forme de kyste lorsque les conditions environnementales lui sont défavorables. Ces kystes benthiques sont sphériques, de 10 µm de diamètre et enfouis dans les sédiments (phase immobile haploïde), ce qui les rend difficiles à détecter et identifier (Kim *et al.* 2015). La viabilité des kystes est supérieure à 3 mois en obscurité et au froid (Tomas 1978). La germination des kystes a lieu lorsque la température est supérieure à 15°C pour donner la forme mobile diploïde planctonique.

■ Production de métabolites/toxines

Initialement, *H. akashiwo* était connue pour produire des composés « phenolic-like » similaires à ceux des macroalgues brunes. Plus tard, d'autres études ont montré que cette espèce pouvait déclencher des mécanismes cellulaires capables d'engendrer une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), à l'origine de dommages cellulaires importants (Chang *et al.* 1990). La surproduction des espèces réactives de l'oxygène aurait des effets hémolytiques sur les branchies de poissons (Aquino-Cruz *et al.* 2020). Plusieurs Raphidophytes ont été identifiés comme producteurs de PUFAs (acides gras polyinsaturés) particuliers et de glycolipides ayant une activité hémolytique. Certains auteurs ont rapporté que cette espèce pouvait produire des composés **BTX-2 et BTX-2 oxydés** et des « brevetoxin-like », causant des paralysies cardiaques et/ou respiratoires et des comportements anormaux chez les poissons (Khan *et al.* 1997). Or, seuls les temps de rétention (RT) des pics de chromatographie en UV-HPLC ont été comparés aux standards, **ce qui ne permet pas de confirmer *stricto sensu* la présence effective des toxines.**

Des interférences au niveau de la régulation du Ca²⁺ (homéostasie calcique) dans les cellules nerveuses ont été reportées sans que la molécule soit définie chimiquement, mais comme étant un composé bioactif unique, spécifique à l'espèce *H. akashiwo* (Twiner *et al.* 2005). Astuya *et al.* (2015) ont montré qu'une molécule proche du brevénal, à action antagoniste des brevétoxines, serait présente dans certaines souches de *H. akashiwo*.

■ Influence des facteurs environnementaux sur la croissance et la production de toxines

Plusieurs études ont montré que divers facteurs abiotiques, tels que la salinité (optimum à 25), le pH (optimal entre 8,5-9 d'après Iwasaki et Sasada (1969)), la charge en nutriments, la température

(entre 15 et 22°C) et la lumière avaient un impact significatif sur la formation et la régulation des efflorescences de *H. akashiwo* (Herndon et Cochlan 2007; Shikata *et al.* 2008a; Shikata *et al.* 2008b; Harvey et Menden-Deuer 2011; Wang *et al.* 2011b). Selon Herndon et Cochlan (2007), les efflorescences de *H. akashiwo* peuvent être initiées et exacerbées par une concentration de 50 µg d'azote par litre, que la source soit NH₄, NO₃ ou urée, avec toutefois un taux de croissance plus rapide lorsque la source est le NH₄. Wang *et al.* (2011a) montrent que cette espèce croît davantage avec différents composés organiques phosphorés dissous (DOP) tels que l'adénosine 5-triphosphate, glucose-6-phosphate. Selon Cochlan *et al.* (2013), la quantité de toxines serait maximale en début de phase stationnaire de croissance (confirmée par Gallardo-Rodríguez *et al.* (2020) et après un épuisement en azote du milieu.

■ Répartition géographique



Figure 29 : Occurrence de *Heterosigma akashiwo* (d'après les données du GBIF en novembre 2020, détail en annexe 6).

3.2.2 *Chattonella* (*C. marina*, *C. antiqua*, *C. ovata*)

Pour la taxinomie se reporter à la Figure 27a.

De la même famille des *Chattonellaceae* que le genre *Heterosigma*, le genre *Chattonella* comprend plusieurs espèces dont l'espèce *C. marina*. D'autres espèces telles que *C. antiqua*, *C. ovata* et *C. subsalsa* possèdent également un potentiel ichtyotoxique (Khan *et al.* 1996b; Haque et Onoue 2002). Synonyme de *Chattonella marina* : *Hornellia marina*.

■ Morphologie et structure

Les cellules sont oblongues, en forme de goutte, de taille comprise entre 30 et 70 µm de long, et 20-30 µm de large, avec deux flagelles isomorphes en position apicale. Les chloroplastes ellipsoïdes sont nombreux (>10) et arrangés radialement. De couleur marron-doré, la cellule possède plusieurs pigments tels que la chlorophylle a, c1 et c2, la fucoxanthine et des β-carotènes.

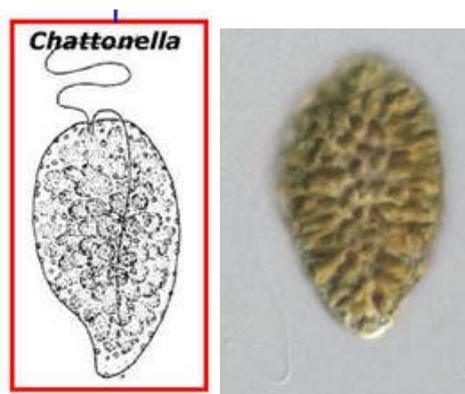


Figure 30 : Illustration de *Chattonella* spp. d'après Neaud-Masson et Brun (2020) (schéma d'après Tomas (1997)) et photo en microscopie photonique de *C. marina* (Cellule vivante ©J. Larsen)

■ Cycle de vie

La reproduction est sexuée avec formation de zygote chez *C. marina* (Subrahmanyam 1954). Les cellules végétatives, mobiles sont diploïdes alors que les kystes, obtenus par méiose, sont haploïdes. La formation de kystes a été initialement observée dans la mer de Sato (Japon) par Imai et Itoh (1987), en hiver dans les sédiments, en phase de latence, avant de réensemencer la colonne d'eau l'été suivant et proliférer à la surface. Cette phase est très importante dans la régulation et la réapparition des marées rouges (« red tides »). Les kystes de *C. marina* sont de forme hémisphérique d'un diamètre de 25-35 µm et habituellement attachés à des substrats solides (Imai 1989). La formation des kystes s'opère après une forte réduction en N dans le milieu et la germination s'observe qu'après une phase de dormance (>4 mois) à faible température (Imai 1989).

■ Production de toxines / métabolites

La production de **BTX-like** a été rapportée (uniquement sur la base des temps de rétention des pics en chromatographie par HPLC-UV **ce qui ne permet pas de confirmer *stricto sensu* la présence effective de la toxine**) chez *C. marina* et *C. antiqua* (Khan *et al.* 1996b; Keppler *et al.* 2006), ainsi que **BTX-2, BTX-3 et BTX-2 oxydée** chez *C. antiqua* et *marina* en début de phase stationnaire ou au milieu de la phase exponentielle (Endo *et al.* 1992; Khan *et al.* 1996b; Haque et Onoue 2002). Wu *et al.* (2012) a caractérisé par HPLC-UV complété par des tests hémolytiques, la présence de 5 métabolites hémolytiques chez *C. marina* non identifiés structuralement. Enfin, une étude plus récente (Band-Schmidt *et al.* 2012), réalisée sur plusieurs souches de *Chattonella sp.* et de *Fibrocapsa japonica* (trouvées BTX positives dans des travaux antérieurs) n'a pas confirmé la présence des BTX par LC-MS et RMN.

Par ailleurs, les 3 espèces *C. antiqua*, *C. marina*, et *C. ovata* sont connues pour générer une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène qui engendrent des blessures au niveau des tissus branchiaux (Hiroishi *et al.* 2005).

Marshall *et al.* (2002) démontrent que les cellules de *C. marina* contiennent des taux élevés d'acides gras polyinsaturés potentiellement toxiques tels que l'EPA (acide eicosapentaénoïque). De même, la présence d'ion superoxyde avec une faible concentration d'EPA accélère de 3 fois le taux de mortalité des poissons étudiés, indiquant un possible effet synergique de cette combinaison (ROS vs FFA) chez *C. marina* (Marshall *et al.* 2003; Dorantes-Aranda *et al.* 2015).

■ Influence des facteurs environnementaux sur la croissance et production de toxines

Les plus fortes densités des espèces du genre *Chattonella* (ie. *marina*, *subsalsa* et *antiqua*) s'observent en fin d'été ou au début du printemps dans des eaux riches en matières organiques (Biecheler 1936; Mignot 1976). La croissance optimale de *C. antiqua* s'effectue à des températures de 25°C, à des salinités entre 25-41 et à des luminosités modérées à faibles. Un pH de 7,6-8,3 n'affecte pas le taux de croissance (Nakamura et Watanabe 1983). *C. antiqua* réalise de fortes migrations verticales diurnes, en surface la journée (pour la lumière), et près des sédiments (pour les nutriments), la nuit. Les efflorescences de *C. antiqua* apparaissent pendant l'été, lorsque la stratification thermique est maximale, prenant un ascendant compétitif sur les diatomées (Watanabe

et al. 1983; Imai et Yamaguchi 2012). Cette migration serait déclenchée par la lumière bleue perçue par les cellules mobiles (Shikata *et al.* 2013).

■ Répartition géographique

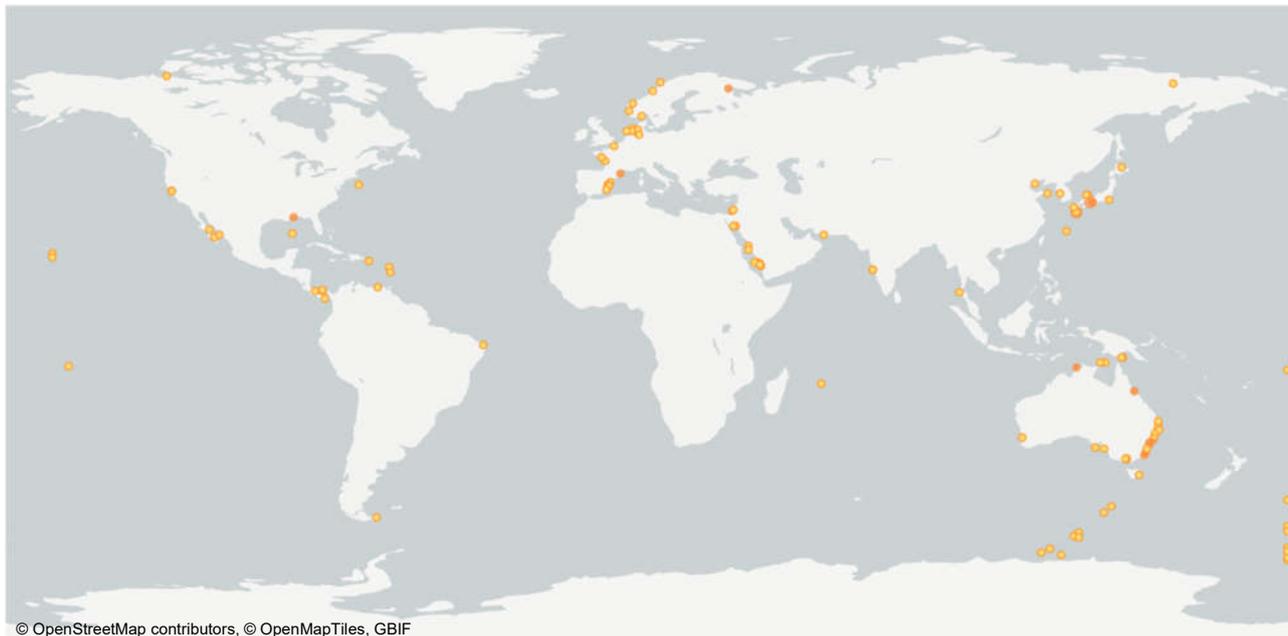


Figure 31 : Occurrence de *Chattonella* (d'après les données du GBIF en novembre 2020, détail en annexe 6).

Chattonella subsalsa a été collectée pour la première fois dans le sud de la France dans des eaux saumâtres riches en matière organique en 1936 par Biecheler (1936). Depuis, sa répartition est mondiale, peuplant diverses régions côtières des USA.

C. antiqua a été fréquemment observée dans différentes régions du Japon et également au niveau des côtes allemandes (Vrieling *et al.* 1995).

C. marina a une large distribution et a été retrouvée dans les eaux riches d'Inde, du Japon, Hong Kong, Russie, Suède, Amérique du Nord, Mexique, Australie, et Nouvelle-Zélande. *C. ovata* a quant à elle une répartition plus limitée à l'Asie (Japon et Hong Kong) (Kai *et al.* 2006).

3.2.3 *Fibrocapsa japonica* S. Toriumi & H. Takano 1973

Pour la taxinomie se reporter à la Figure 27c.

Le genre *Fibrocapsa* appartient à la même famille (*Chattonellaceae*) que les deux espèces précédentes, et n'est représentée que par une seule espèce : *F. japonica*.

Les synonymes de *Fibrocapsa japonica* : *Chattonella japonica*

■ Morphologie et structure

Les cellules sont ovales et légèrement aplaties, de taille comprise entre 20-30 µm de longueur et 15-20 µm de large, avec deux flagelles hétéromorphes insérés dans une gouttière apicale. Les chloroplastes de forme discoïdes sont nombreux (>10) répartis dans toute la cellule. Présence de mucocystes (organelle éjectile similaire aux trichocystes des dinoflagellés) longiformes dans la partie postérieure de la cellule, caractéristique de l'espèce. De couleur marron-doré, *F. japonica* possède les mêmes pigments accessoires que *H. akashiwo* et *C. marina*.



Figure 32 : Illustration de *Fibrocapsa japonica* (à gauche, schéma d'après (Tomas 1997) ; au milieu, photo en microscopie photonique montrant dans la partie postérieure les mucocystes (flèche) (Cellule vivante ©J. Larsen) ; à droite cellules lugolées (Nézan et al. 2014).

■ Cycle de vie

Cycle de vie semblable aux deux autres Rapidophytes, possédant les deux phases (mobile-diploïde) à immobile (haploïde). Les kystes de *F. japonica* sont de morphologie similaire à ceux de *C. marina* mais de taille inférieure (15 à 20 µm de diamètre) et attachés à des substrats solides ou rocheux (Yoshimatsu 1987).

■ Production de métabolites/toxines

La production de composés **BTX-like** appelés fibrocapsine a été reportée pour l'espèce *F. japonica* (OSPAR 2000) avec la même méthode analytique que précédemment citée pour *Chattonella* et *Heterosigma*, *i.e.* la comparaison des temps de rétention des pics en chromatographie par HPLC-UV avec les standards BTX (Khan et al. 1996a; Keppler et al. 2006), **ce qui ne permet pas de confirmer stricto sensu la présence effective de la toxine**. (Khan et al. 1996a) ont rapporté que des souches de *F. japonica* produisaient des équivalents à la BTX-2, BTX-2 oxydée et BTX-9 ; leur variation toxique étant corrélée à la phase de croissance des cellules (milieu de la phase exponentielle et début de phase stationnaire) principalement. Ces résultats non pas été confirmés (Band-Schmidt et al. 2012) par LC-MS et RMN. Cette espèce synthétise de nombreux acides gras (PUFA) comme FJ1 (acide octadécatétraénoïque), FJ2 (acide eicosapentaénoïque) et FJ3 (acide eicosatétraénoïque) à activité hémolytique selon Fu et al. (2004). *F. japonica* peut également générer des espèces réactives de l'oxygène (dont l'ion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène, Oda et al. (1997). L'étude de Dorantes-Aranda et al. (2015) suggère que d'autres molécules responsables de l'ichthyotoxicité de *F. japonica*, majoritairement de structure lipidique, sont encore inconnues.

■ Répartition géographique

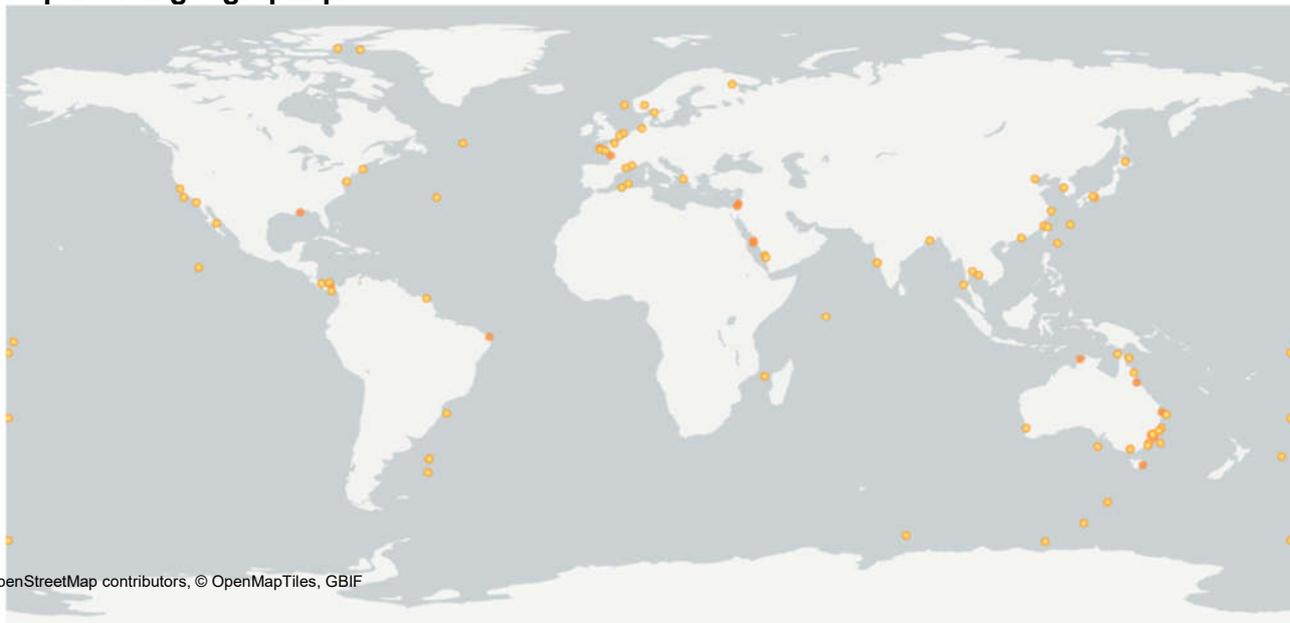


Figure 33 : Occurrence de *Fibrocapsa* (d'après les données du GBIF en novembre 2020, détail en annexe 6).

3.3 Bilan sur les microalgues productrices de brevétoxines

Parmi toutes les espèces potentiellement productrices de BTX ou métabolites assimilés, il est à noter que *Karenia brevis*, qui est l'espèce la plus étudiée dans la littérature, est productrice confirmée de brevétoxines (par LC/MS-MS et/ou RMN) et d'autres métabolites secondaires bioactifs (voir Tableau 3).

K. brevis n'a pas été recensée sur le littoral français à ce jour (selon les données REPHY de l'Ifremer, plus de détails dans la partie 7.4.1). Cependant, la vigilance s'impose puisque des espèces exogènes ont déjà été introduites accidentellement au cours de ces dernières années (par ballast) et que *K. brevis* a des capacités adaptatives élevées propres à la plupart des dinoflagellés (migration verticale nyctémérale forte, enkystement) et d'autres qui lui sont spécifiques (euryèce, capable de prolifération).

D'autres espèces de microalgues sont suspectées de produire des brevétoxines, sur la base d'analyses par ELISA ou HPLC-UV mais les métabolites n'ont pas encore été élucidés par des méthodes physico-chimiques. C'est le cas de *K. mikimotoi*, *K. bicuneiformis*, *Chattonella marina*, *C. antiqua*, *Heterosigma akashiwo* et *Fibrocapsa japonica*. Pour *K. papilionacea*, la production de BTX-2 a été confirmée en conditions de laboratoire par UPLC/HRMS et RMN. Ces espèces sont présentes sur les côtes françaises (mais elles n'ont pas encore été étudiées pour confirmer la production de BTX en France).

Ces espèces, ainsi que *H. akashiwo*, sont également capables de produire divers métabolites à activité ichthyotoxique, hémolytique et cytotoxique, dont la structure chimique n'a pas été caractérisée pour une grande majorité. Ce manque de données constitue un challenge majeur en océanographie et en écotoxicologie, car les espèces de *Karenia* et les 3 Raphidophytes sont détectées de manière récurrente dans les eaux européennes et capables de proliférer pour certaines. Elles sont très toxiques pour les invertébrés et l'ichtyofaune en général. Il est par conséquent nécessaire de continuer à approfondir les recherches sur ces organismes pouvant engendrer de forts dommages économiques (fortes mortalités en conchyliculture et aquaculture) et écologiques (compétition inter-espèce et réduction de la diversité phytoplanctonique, dysfonctionnement de l'hydrosystème).

3.4 Elimination des efflorescences

Plusieurs stratégies de traitement basées sur des approches chimiques, physiques ou biologiques ont été testées pour éliminer spécifiquement les efflorescences de *K. brevis*.

Des essais d'élimination des efflorescences de *K. brevis* à l'aide de sulfate de cuivre ont été réalisés dès le milieu du XX^e siècle en Floride (Sengco 2009) avec un succès relatif. Si les concentrations en *K. brevis* ont diminué fortement et rapidement dès l'application du traitement, elles ont de nouveau atteint des valeurs importantes dès une dizaine de jours après l'application du traitement. Le sulfate de cuivre ne semble donc pas un traitement durable des efflorescences. En outre, il a fallu appliquer plusieurs tonnes de cuivre dans le milieu naturel (de 40 à 95 tonnes selon les essais) pour obtenir ces résultats. Compte tenu de la toxicité de ce composé chimique sur les écosystèmes, les auteurs ne recommandent pas ce traitement.

D'autres substances chimiques ont été testées en laboratoire pour éliminer *K. brevis*. Seul l'acide diéthylthiocarbamique a montré une efficacité mais cette substance a des effets délétères sur plusieurs espèces du milieu naturel et son coût d'application est trop élevé (Sengco 2009).

Les traitements d'oxydation par l'ozone ont également été testés en laboratoire sur des cultures de *K. brevis* avec des résultats intéressants. La concentration en ozone nécessaire est cependant beaucoup plus importante que celle utilisée généralement dans les filières de traitement des eaux, 25 mg.L⁻¹ d'ozone permettent de détruire 80% des cellules en 10 s en laboratoire mais 135 mg.L⁻¹ sont nécessaires pour abattre 100% de cellules dispersées dans de l'eau de mer (Schneider *et al.* 2003). L'inconvénient principal de l'ozone est l'absence de spécificité vis-à-vis des organismes lors de sa dispersion dans l'eau.

Khan *et al.* (2010) ont montré en laboratoire dans de l'eau de mer synthétique que la photocatalyse de solution de BTX- 3 (16 µM) à 350 nm en présence de dioxyde de titane en poudre est possible. Les auteurs suggèrent que l'addition de ce photocatalyseur dans l'eau de mer pourrait être une nouvelle stratégie de remédiation des brevétoxines lors de l'apparition d'une efflorescence de *K. brevis*. Cependant, il n'existe aucune donnée sur les photoproduits formés lors de la dégradation de ces dernières ni si ces derniers pourraient présenter des effets toxiques sur les écosystèmes.

L'ajout de flocculant à base d'argile, de sels d'aluminium couplé ou non à du charbon actif en poudre a été testé à l'échelle du laboratoire (Sengco 2009). Les traitements par floculation permettent d'agglomérer les algues sans perturber l'intégrité cellulaire, les amas devant sédimenter (Sangco et Anderson 2004). La température, la salinité, le pH et la teneur en oxygène dissous n'ont pas d'effet sur l'efficacité des traitements de floculation (Sengco 2009). S'ils s'avèrent efficaces et peu onéreux dans le cas de l'argile, ces traitements engendrent tout de même une forte libération de toxines dans le milieu. Par ailleurs, s'ils sont utilisés en milieu naturel, ces traitements ne peuvent être appliqués que pendant certains cycles de marée et à petites échelles.

Des essais de bioremédiation de *K. brevis* basés sur l'utilisation d'algicides bactériens ont été développés en laboratoire et doivent être confirmés à grande échelle (Doucette 1995 ; Doucette *et al.* 1997). Zhang *et al.* (2020) a montré que la prodigiosine⁸ a une action algicide contre *Heterosigma akashiwo*.

Toutes ces méthodes sont difficiles et ou coûteuses à mettre en oeuvre car les efflorescences de *K. brevis* peuvent s'étendre jusqu'à plusieurs milliers de kilomètres carrés. Par ailleurs, outre le fait que ces traitements peuvent conduire à la libération de brevétoxines lors de la lyse des cellules de *K. brevis*, ils ne sont généralement pas facilement biodégradables et peuvent s'accumuler dans les organismes marins (Park *et al.* 2011). L'Anses rappelle que pour être employé tout produit biocide doit respecter le règlement européen (UE) n°528/2012 concernant la mise sur le marché et l'utilisation des produits biocides.

⁸ La Prodigiosine est un métabolite secondaire de couleur rouge produit principalement par la bactérie *Serratia marcescens*. Cette molécule, de structure tripyrrolique, présente des activités antitumorales, immunosuppressives, antibiotiques, antifongiques et antipaludiques (Piard 2013)

4 Effets des brevétoxines sur les organismes

Ce chapitre présente un état des connaissances relatives à la toxicité des brevétoxines sur les organismes.

4.1 Cibles moléculaires et cellulaires

4.1.1 Cible moléculaire : le canal sodium sensible au potentiel de membrane

Le canal sodium sensible au potentiel de membrane (canal Na_v) est considéré comme l'unique cible moléculaire des BTX. La mise en évidence et la caractérisation de l'interaction entre BTX et canal Na_v s'est faite à travers de nombreuses études, par une approche multidisciplinaire. Cette interaction entre les BTX et le canal Na_v suffit à rendre compte de la nature essentiellement neurologique des symptômes observés chez l'Homme et l'animal, aux niveaux central et périphérique. Compte-tenu du rôle crucial de ces canaux dans l'excitabilité cellulaire, leur caractère ubiquitaire, et le grand nombre de molécules exogènes s'y fixant (neurotoxines naturelles, insecticides naturels ou synthétiques, anesthésiques etc.), le GT a détaillé la structure et la pharmacologie des canaux Na_v .

Les canaux Na_v forment une famille de protéines transmembranaires qui assurent les flux passifs d'ions Na^+ à la surface des membranes de cellules excitables majoritairement, mais également de cellules non excitables. Ces canaux sont formés d'une sous-unité α , qui contient le pore du canal, et une ou deux sous-unités β , qui influencent les propriétés biophysiques et l'expression de la sous-unité α (Figure 34).

Les gènes codant pour les sous-unités α sont nommés SCN1A à SCN5A et SCN8A SCN11A, et correspondant aux protéines $\text{Na}_v1.1$ à 1.9 respectivement. Les gènes SCN1B à SCN4B codent les sous-unités $\beta1$ à $\beta4$. La sous-unité α est une protéine de 260 kDa, formée par quatre domaines homologues (Figure 34), chacun constitué de six domaines transmembranaires et de leur boucles intra- et extra-cellulaires. Le pore du canal est bordé par les segments 5 et 6 des quatre domaines. La sensibilité au potentiel de membrane est portée par des acides aminés du segment 4.

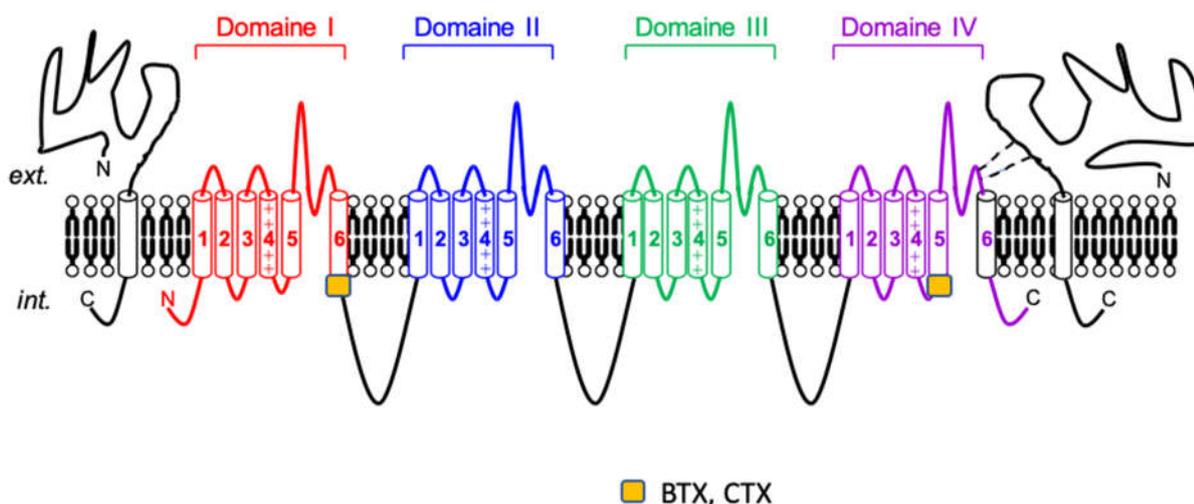


Figure 34 : Structure moléculaire du canal Na_v (d'après Mattei et Legros, 2014). La sous-unité α est constituée des domaines I à IV (en couleur sur le schéma), chacun formé de 6 segments transmembranaires (ou TM, numérotés de 1 à 6). Le pore du canal est bordé par les segments 5 et 6. Le TM 4 est chargé positivement (via la présence de résidus arginines) et constitue le segment responsable de la dépendance au potentiel. La sous-unité α est liée à une ou deux sous-unités β , qui apparaissent à gauche et à droite du schéma. Les BTX, tout comme les CTX, se lient à des acides aminés du TM6 du domaine I et du TM5 du domaine IV. Cette localisation moléculaire a été nommée « site 5 ».

Les canaux Na_v existent sous trois états : fermés, ouverts ou inactivés (Figure 35). À un potentiel de membrane de repos, le canal est fermé. Lorsqu'une dépolarisation atteint le seuil d'ouverture des canaux, ils s'ouvrent rapidement et massivement – les ions Na^+ entrent dans la cellule – amplifiant

la dépolarisation initiale, ce qui correspond à la phase ascendante du potentiel d'action dans une cellule excitable (neurone, fibre musculaire ou cardiomyocyte). Au sommet du potentiel d'action, les canaux Na_v s'inactivent lentement, puis se ferment. La cellule retourne alors à son potentiel de repos.

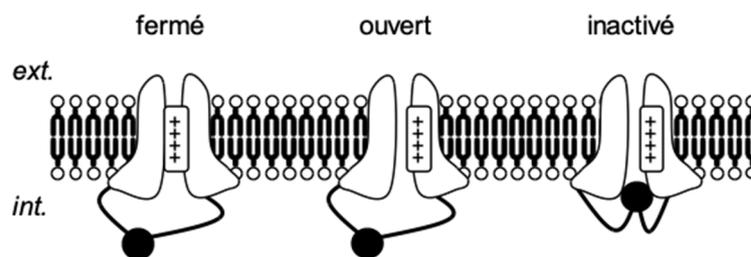


Figure 35 : Les trois états du canal Na_v (d'après Mattei et Legros, 2014). En fonction du temps et du potentiel de membrane, les canaux Na_v peuvent être successivement dans les 3 états fonctionnels suivants: (i) l'état de repos (fermé) à un potentiel très négatif, (ii) l'état activé (ouvert) après dépolarisation et (iii) l'état inactivé (fermé) à la repolarisation.

4.1.2 Cibles cellulaires

Les axones, constituants essentiels des nerfs moteurs et sensoriels, sont extrêmement sensibles à l'action des BTX. Les premières descriptions du mode d'action des BTX – en utilisant les techniques électrophysiologiques en potentiel imposé (« voltage-clamp »), ou en courant imposé (« current clamp ») – ont été réalisées sur des axones géants de calamar ou d'écrevisse ou des neurones de ganglions d'Aplysie. Globalement, des extraits de dinoflagellés et/ou les BTX purifiées provoquent une dépolarisation membranaire, réversible et dose-dépendante. La dépolarisation maximale peut atteindre 30 mV avec la BTX-3 (Wu *et al.* 1985). Cette dépolarisation de la membrane nerveuse provoquée par les BTX-2 et la BTX-3 est inhibée lorsque le milieu extracellulaire est dépourvu d'ions Na^+ , ou en présence de tétrodontoxine (TTX) (Atchison *et al.* 1986) qui bloque les canaux Na_v (voir ci-dessous).

Ces données indiquent clairement que la dépolarisation de la membrane nerveuse est produite par une entrée de Na^+ depuis le milieu extracellulaire, ce qui a été corroboré par des études de flux radioactif en utilisant le $^{22}\text{Na}^+$ (Catterall et Gainer 1985). Une conséquence de cette dépolarisation membranaire est l'apparition transitoire de potentiels d'action spontanés et/ou répétitifs lors d'une stimulation nerveuse unique. Au niveau des axones de motoneurones, une augmentation TTX-sensible de volume des nœuds de Ranvier a été décrite suite à l'action de BTX, et valide l'hypothèse d'une entrée de Na^+ dans l'axone neuronal et des désordres osmotiques consécutifs, notamment une entrée d'eau (Mattei *et al.* 1999).

Les terminaisons nerveuses motrices amyéliniques du nerf phrénique innervant l'hémi-diaphragme de rat, ainsi que des terminaisons nerveuses innervant des muscles squelettiques de grenouille sont également sensibles à l'action des BTX. Il faut noter que la densité de canaux Na_v au niveau des terminaisons nerveuses de mammifères et de batraciens est inférieure à celle présente sur les axones myélinisés au niveau des nœuds de Ranvier ou de l'hémi-nœud (Van Der Kloot et Molgo 1994). La BTX-3 augmente la libération quantique spontanée asynchrone d'acétylcholine (ACh) détectée sous forme de potentiels de plaque motrice miniatures (PPMm) dans des préparations neuromusculaires *in vitro* (Gallagher et Shinnick-Gallagher 1980; Wu *et al.* 1985; Atchison *et al.* 1986).

De même, la BTX-3 provoque de façon transitoire l'apparition de potentiels de plaque motrice (PPM) spontanés, dus à la libération quantique synchrone d'ACh, puis elle provoque un blocage de la libération déclenchée par la stimulation du nerf moteur, et un blocage de la transmission neuromusculaire. Ces deux types d'effets ont été attribués à la dépolarisation membranaire neuronale médiée par les ions Na^+ (Shinnick-Gallagher 1980), alors qu'une déplétion du stock en neurotransmetteur a été proposée pour expliquer l'origine du blocage de la transmission neuromusculaire par la BTX-3. Cependant, l'analyse morphologique des terminaisons nerveuses motrices en microscopie électronique n'a pu démontrer de déplétion des vésicules synaptiques

claires au niveau des jonctions neuromusculaires de rat fixés au moment du blocage de la transmission neuromusculaire (Baden *et al.* 1984). Des études ultérieures ont montré que l'augmentation de libération quantique spontanée d'ACh provoqué par la BTX-3 se produit même en l'absence nominale de Ca^{2+} extracellulaire (Meunier *et al.* 1997). Ces données vont à l'encontre de l'hypothèse selon laquelle l'augmentation de libération quantique spontanée d'ACh dépend d'un influx de Ca^{2+} provoquée par la dépolarisation des terminaisons nerveuses (Atchison *et al.* 1986), et suggèrent que la libération quantique spontanée d'ACh peut se produire sans la participation d'un influx d'ions Ca^{2+} , et que d'autres mécanismes de libération sont impliqués.

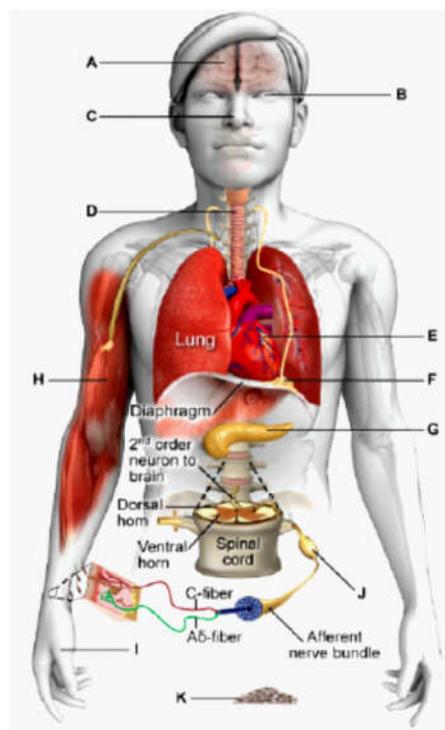
4.1.2.1 Expression tissulaire

Les sous-types de canaux Na_v ont des profils d'expression tissulaire bien établis au niveau des cellules excitables musculaires et neuronales mais aussi des sites d'expression moins canoniques (Goldin 2001; Trimmer et Rhodes 2004; Brackenbury 2012; Black et Waxman 2013) (Figure 36). D'un point de vue pharmacologique, les 9 sous-types de canaux sodium ($Na_v1.1-1.9$) sont classés par leur sensibilité à la TTX, une toxine présente dans certaines espèces de poissons (type tétrodons) et animaux terrestres (salamandres, crapaud). On les qualifie de sensibles à la TTX (TTX-S) ou résistants à la TTX (TTX-R). Les canaux $Na_v1.1, 1.2, 1.3 ; 1.4, 1.6$ et 1.7 sont TTX-S, alors que les canaux $Na_v1.5, 1.8$ et 1.9 sont TTX-R.

- Le canal $Na_v1.1$, codé par le gène SCN1A, est exprimé au niveau du système nerveux central (SNC) et périphérique (SNP) ainsi qu'au niveau des kératinocytes et des cellules cancéreuses (de l'ovaire).
- Le canal $Na_v1.2$, codé par le gène SCN2A, est exprimé au niveau du SNC et SNP ainsi qu'au niveau des fibroblastes, des cellules β des îlots de Langerhans, des odontoblastes, des ostéoblastes et de cellules cancéreuses (col de l'utérus (cervix), du mésothéliome, de l'ovaire, de la prostate).
- Le canal $Na_v1.3$, codé par le gène SCN3A, est la forme fœtale des sous-unités α qui est exprimé au niveau du SNC et SNP en cas de lésion. Il est aussi retrouvé au niveau des fibroblastes, des cellules β des îlots de Langerhans et des cellules cancéreuses (de l'ovaire, de la prostate, du cancer du poumon à petite cellules).
- Le canal $Na_v1.4$, codé par le gène SCN4A, est exprimé au niveau du tissu musculaire squelettique, ainsi qu'au niveau des cellules endothéliales, des globules rouges et des cellules cancéreuses (du cervix utérin, de l'ovaire et de la prostate).
- Le canal $Na_v1.5$, codé par le gène SCN5A, est exprimé au niveau du tissu musculaire lisse, cardiaque et squelettique fœtal ou dénervé ainsi qu'au niveau des cellules endothéliales, des globules rouges et des cellules cancéreuses (du cancer du sein, du colon, du lymphome, et du neuroblastome dont c'est le sous-type majoritaire, du cancer du poumon à petites cellules ou non à petites cellules et du cancer de l'ovaire).
- Le canal $Na_v1.6$, codé par le gène SCN8A, est exprimé au niveau du SNC et SNP ainsi qu'au niveau des fibroblastes, kératinocytes, macrophages, cellules endothéliales, et des cellules cancéreuses (du cancer du sein, du cervix utérin, du lymphome, du mélanome, du mésothéliome pulmonaire (plèvre), du cancer du poumon non à petites cellules, du cancer de la prostate, du cancer du poumon à petites cellules).
- Le canal $Na_v1.7$, codé par le gène SCN9A, est exprimé au niveau du SNC et SNP ainsi qu'au niveau du tissu musculaire lisse, de la prostate, de progéniteurs érythroïdes, des fibroblastes, des cellules immunitaires et des cellules cancéreuses (du cancer du sein, du cervix utérin, du lymphome, du mésothéliome, du cancer du poumon non à petites cellules, du cancer de l'ovaire et du cancer de la prostate pour lequel le sous-type $Na_v1.7$ est la forme prédominante).
- Le canal $Na_v1.8$, codé par le gène SCN10A, est exprimé au niveau du SNC et du SNP, ainsi qu'au niveau des cellules endothéliales, des fibroblastes, des kératinocytes et des lymphocytes T.
- Le canal $Na_v1.9$, codé par le gène SCN11A, est exprimé au niveau du SNC et SNP ainsi qu'au niveau des cellules endothéliales, des fibroblastes et des lymphocytes T mais aussi

au niveau des cellules cancéreuses (de lymphome et du cancer du poumon à petites cellules).

- Le canal Na_vX, codé par le gène SCN7A, est un sous-type de canal sodium qui n'est pas dépendant du potentiel, mais de la concentration extracellulaire de sodium (Hiyama *et al.* 2002). Il est exprimé au niveau du SNC et SNP ainsi qu'au niveau du poumon, de l'utérus et du cœur.



	Tissu	Sous-type de canal Nav exprimé
A	Système nerveux central	1.1, 1.2, 1.3, 1.6
B	Rétine	1.8, 1.9
C	Neurones olfactifs	1.7
D	Neurones sensoriels et neurones innervant les voies respiratoires	1.7, 1.8, 1.9
E	Cœur	1.5, 1.8
F	Nerfs, muscles respiratoires	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.6, 1.7
G	Cellules β pancréatiques	1.7
H	Muscles squelettiques	1.4
I	Peau	1.7, 1.8
J	Neurones sensoriels de la racine dorsale	1.1, 1.3, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9
K	Cellules cancéreuses métastatiques	1.1, 1.9

Figure 36 : Expression tissulaire des canaux Na_v (d'après De Lera Ruiz et Kraus (2015); il s'agit d'une traduction non officielle d'un article paru dans une publication de l'ACS)

Les canaux Na_v sont sélectifs aux ions Na⁺ mais aussi aux ions Li⁺. Les sous-types TTX-S ont des cinétiques d'activation et d'inactivation relativement rapides comparées à celles des sous-types TTX-R. Les BTX-2 et -3 ont une affinité plus élevée pour les sous-types de canaux Nav musculaires ou cérébraux que pour le sous-type cardiaque (Bottein Dechraoui et Ramsdell 2003; Bottein Dechraoui *et al.* 2006).

Des expériences de liaison ont en effet montré que l'affinité de la BTX-3 pour les canaux Na_v1.2 (neuronal) et Na_v1.4 (musculaire) est supérieure à celle pour Na_v1.5 (cardiaque), ce qui indique que les BTX se fixent préférentiellement à certains canaux Nav dans l'organisme. L'affinité – mesurée par l'estimation de son K_d par compétition dans des cellules transfectées – de la BTX-3 pour Na_v1.2 est de l'ordre de 2,4 nM ; 1,8 nM pour Na_v1.4 et 12 nM pour Na_v1.5 (Konoki *et al.* 2019).

4.2 Toxicité *in vitro*

4.2.1 Modification des propriétés biophysiques du canal Na_v par les BTX

Les BTX se lient au canal Na_v au niveau du site 5, qui correspond à des résidus du TM6 du domaine I et du TM5 du domaine IV (Catterall et Gainer 1985; Lombet *et al.* 1987; Trainer *et al.* 1994) (Figure 34). Ce site est également le domaine de liaison des ciguatoxines (CTX) sur le canal Na_v. La fixation BTX/site 5 aboutit à une activation du canal Na_v par deux mécanismes (Sheridan et Adler 1989; Jeglitsch *et al.* 1998).

Le premier est une activation persistante du canal par déplacement de sa dépendance au potentiel membranaire vers des potentiels négatifs, c'est-à-dire que le canal Na_v a tendance à s'ouvrir à des potentiels proches du potentiel de repos, de manière anormale (Figure 37-A). Le second mécanisme est un ralentissement – voire un blocage – de l'inactivation du canal, ce qui empêche sa fermeture complète (Figure 37-B). Les deux mécanismes favorisent l'entrée d'ions Na^+ dans la cellule, et la dépolarisation membranaire. La fixation des BTX au canal Na_v est caractérisée par une haute affinité (Kd de la 3H -BTX-3 aux canaux Na_v des cellules chromaffines : 32 nM (Yuhi *et al.* 1994)).

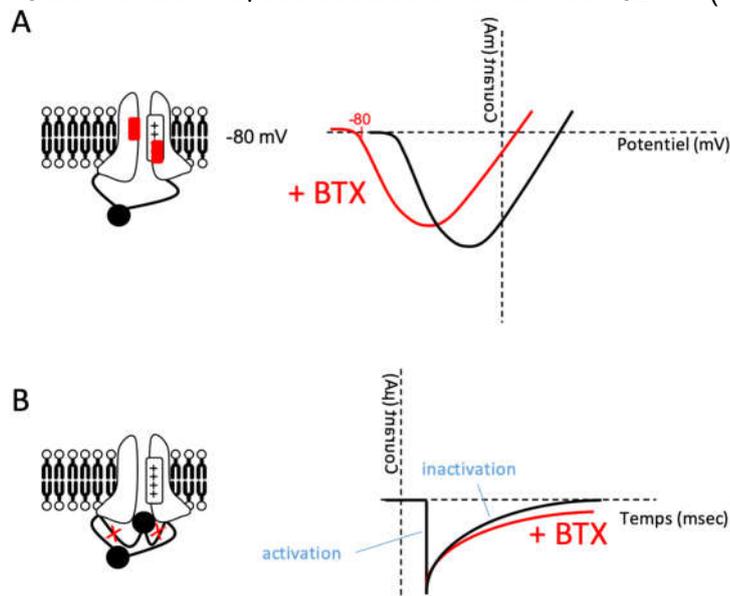


Figure 37 : Effets des BTX sur les propriétés biophysiques des canaux Na_v (d'après Mattei et Legros, 2014). A : les BTX déplacent la courbe d'activation du courant vers des potentiels négatifs (on notera la réduction de la valeur maximale du courant, et donc une diminution de la conductance). B : les BTX induisent un ralentissement de l'inactivation des canaux Na_v , ce qui équivaut à une fermeture inaboutie du canal. L'interaction des BTX avec le site 5 du canal Na_v induit des modifications allostériques, qui influencent positivement ou négativement les interactions d'autres neurotoxines avec d'autres sites de fixation.

En ralentissant la cinétique d'inactivation des canaux Na_v et en favorisant une diminution du seuil d'excitabilité des cellules excitables, les BTX induisent une activation persistante qui se traduit par l'apparition de potentiels d'action spontanés et répétitifs. Au niveau du système nerveux, il en résulte une suractivation de différentes populations de neurones, centraux, moteurs et sensoriels, et de cellules musculaires.

4.2.2 Effets des BTX au niveau du canal Na_v unitaire neuronal et cardiaque

Les effets de la BTX-3 et de certains de ses dérivés ont été étudiés en utilisant la technique du potentiel imposé sur fragment de membrane (patch-clamp) donnant accès à des enregistrements unitaires du canal Na_v . Des neurones sensoriels embryonnaires du ganglion noueux (ganglion inférieur du nerf vague) de rat, dont le courant Na^+ est sensible à la TTX ont été utilisés (Jeglitsch *et al.* 1998). Dans ces conditions, aucune activité de canal n'est détectée lorsque la TTX (1 μ M) est ajoutée à la pipette de patch, alors que l'activité du canal Na_v est clairement visible en présence de BTX-3 (100 nM) dans la pipette, et inhibée par la TTX. La relation courant-voltage unitaire en présence de BTX-3 est linéaire, avec un potentiel d'inversion d'environ +60 mV et deux types d'amplitudes de courants unitaires ont été observés. Lorsque la pipette contenait la BTX-3 (30-500 nM) les effets au niveau des canaux unitaires Na_v peuvent se résumer ainsi :

- (i) déplacement de l'activation d'environ 10 mV vers des valeurs plus négatives de potentiel ;
- (ii) inhibition de l'inactivation des canaux Na_v à tous les potentiels de membrane auxquels l'activité des canaux unitaires est observée, lors de sauts de potentiel dépolarisants maintenus ;

- (iii) le temps moyen d'ouverture apparent du canal est augmenté d'environ 2 fois à tous les potentiels de membrane ;
- (iv) l'apparition d'états de sous-conductance de 10,7 et 21,2 pS.

Des différences biophysiques des canaux unitaires Na_v ont pu être démontrées avec des dérivés de la BTX-3, tels que la BTX-6, la 2,3,41,43-tetrahydro-BTX-3, la 2,3,27,28,41,43-hexahydro-BTX-3, et la 2,3-dihydro-BTX-3 A-ring diol qui permettent d'établir des sites de liaison et d'interaction divers au sein de la molécule de la BTX-3.

Les effets de la BTX-3 ont également été étudiés sur des canaux unitaires Na_v cardiaques, dans des cardiomyocytes ventriculaires dissociés de rat adulte (Schreibmayer et Jeglitsch 1992). La BTX-3 déplace l'activation des canaux Na_v vers des valeurs plus négatives de potentiel, et les canaux unitaires ont un temps prolongé d'ouverture, même lors de sauts de potentiels prolongés. L'ouverture du canal unitaire présente jusqu'à 9 sous-états de conductance qui sont fonction du potentiel transmembranaire. Ces états de sous-conductance seraient en relation avec les différents états conformationnels des portes d'activation du canal. Dans des conditions physiologiques, lorsque le canal Na_v s'ouvre directement à partir de son état fermé, ces états ouverts « incomplets » du canal Na_v cardiaque sont obscurcis par des transitions de déclenchement rapides entre les états pré-ouverts correspondants, électriquement silencieux. Ainsi, la BTX-3 agit principalement via la stabilisation de la pré-ouverture du canal et des différents états ouverts.

4.2.3 Conséquences de l'augmentation du calcium intracellulaire induite par les BTX

La dépolarisation membranaire induite par les BTX favorise l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire et de nombreux mécanismes Ca^{2+} -dépendants, comme la libération de neurotransmetteur ou d'hormone, et la modulation de la contraction musculaire (Huang *et al.* 1984; Cao *et al.* 2008; Liberona *et al.* 2008).

4.2.4 Des antagonistes naturels

Plusieurs polyéthers naturels, de masse molaire plus faible que les BTX, ont été caractérisés au cours des quinze dernières années, et leur intérêt réside dans leur capacité à bloquer les effets des BTX. Il s'agit du brevénal et du gambierol. Le brevénal – qui est un métabolite produit par *Karenia brevis* – se lie au canal Na_v , avec une affinité plus faible que les BTX, mais il perturbe leur liaison et inhibe leur toxicité *in vitro* et *in vivo* (Bourdelaïs *et al.* 2004; Abraham *et al.* 2005; Bourdelaïs *et al.* 2005). Ainsi, dans un modèle mammifère de bronchoconstriction et dans les essais *in vitro* de génotoxicité, le brevénal s'oppose aux effets des BTX-2 et -3, suggérant que le dinoflagellé *K. brevis* produit simultanément des neurotoxines qui affectent les voies respiratoires, ainsi qu'un métabolite aux vertus potentiellement thérapeutiques (le brevénal) (Abraham *et al.* 2005).

4.2.5 Conclusions

- Les cibles principales des BTX sont les canaux sodium Na_v , dont il existe neuf isoformes exprimées très majoritairement dans le système nerveux central et périphérique.
- Les canaux Na_v sont à l'origine de l'excitabilité neuronale et musculaire. Leur ouverture correspond à la phase ascendante du potentiel d'action.
- Les BTX se lient aux canaux Na_v et perturbent deux de leurs propriétés biophysiques : elles ralentissent la phase d'inactivation et favorisent leur activation à des potentiels membranaires plus négatifs que le seuil normal d'activation de ces canaux.
- Les BTX peuvent donc être considérées comme des activateurs des canaux Na_v , à l'instar des ciguatoxines : ce faisant, elles dépolarisent les membranes neuronales et musculaires et favorisent leur excitabilité ainsi que les mécanismes intracellulaires dépendants du Ca^{2+} .

- Le brévénal, produit par *K. brevis*, possède une activité antagoniste des BTX, en se liant aux canaux Na_v et en perturbant la liaison des BTX.

4.3 Génotoxicité

La capacité de certaines BTX à former des adduits à l'ADN a été étudiée (Radwan et Ramsdell 2008). Dans un système acellulaire, après 18 h d'incubation à 37°C de BTX-6 à 200 µM avec 2 nucléosides isolés, l'analyse par RIA a mis en évidence la possible formation d'adduits avec la cytidine et dans une moindre mesure avec la guanosine, adduits qui ne sont pas observés dans le groupe contrôle. Les auteurs ont ensuite montré qu'après une exposition de 18 h à 37°C d'une suspension de fibroblastes pulmonaires de rat (lignée RFL-6), la quantité d'adduits en présence de BTX-2⁹ (35 µM) était environ 4 fois supérieure à celle retrouvée en présence de la même concentration de BTX-6 (115 vs 34 pg eq. BTX-6/µg d'ADN). La LC-MS/MS a permis d'identifier des adduits BTX-2-cytidine mais pas d'adduits formés avec la BTX-6.

Dans cette même étude, des rats mâles ont reçu de la BTX-2 ou de la BTX-6 à 45 µg/kg pc par instillation intratrachéale (bolus). Les rats du groupe témoin ont reçu le même volume de véhicule. Les rats ont été sacrifiés 24 h après le traitement et les poumons ont été prélevés immédiatement et maintenus congelés à -80°C jusqu'à l'extraction de l'ADN, puis après hydrolyse, les adduits ont été purifiés, concentrés avant analyse par RIA ou par LC-MS. Les analyses par RIA de l'hydrolysate d'ADN ont montré que la BTX-2 induit la formation de 4 fois plus d'adduits que la BTX-6 (24 vs 6 pg équival. BTX-3/µg d'ADN). Par LC/MS, des adduits BTX-2-guanosine, BTX-2-adénine et BTX-2-adénosine ont été mis en évidence à partir de l'ADN des cellules pulmonaires alors qu'aucun adduit de BTX-6 n'a été détecté.

Les auteurs ont conclu que, *in vitro*, la BTX-2 forme des adduits d'ADN avec la cytidine après traitement de cellules pulmonaires isolées et forme des adduits à l'ADN avec l'adénosine et la guanosine après exposition intratrachéale. Les résultats de cette étude sont exprimés de façon qualitative, en comparant le « rapport d'induction » suite à un traitement avec la BTX-2 vs la BTX-6. Il n'y a pas d'information quantitative précise des adduits de l'ADN (par exemple, x adduits pour 10⁷ ou 10⁸ nucléotides) et aucune comparaison à des groupes non traités n'a été effectuée. On peut considérer qu'il s'agit d'une identification d'adduits (spécifiques) qui pourrait être utilisés comme marqueur d'exposition par exemple. Ces résultats ne permettent pas de rendre compte de la significativité biologique de la présence d'adduits à l'ADN, qui nécessite la prise en compte de leur persistance. De plus, dans une approche de type poids des preuves (voir Annexe 5), les adduits *in vitro* et *in vivo* ont un poids faible. À ce titre, ils pourraient tout au plus constituer une alerte qu'il serait nécessaire de confirmer dans des expérimentations consolidées.

La capacité de BTX à induire une fragmentation de l'ADN a été évaluée par trois tests des comètes *in vitro* et un test des comètes *in vivo*.

Dans une 1^{ère} étude (Sayer *et al.* 2005), des lymphocytes primaires humains ont été exposés aux BTX-2, BTX-3 et BTX-9 à 2 concentrations (1 pM et 10 nM) pendant 1 h. Le test des comètes a ensuite été réalisé et la fragmentation de l'ADN a été quantifiée à l'aide d'un système d'analyse d'images pour au moins 150 cellules/groupe puis le paramètre de fragmentation « *Tail moment* » a été calculé. D'après les auteurs, les résultats montrent que les BTX testées à des concentrations de 1 pM et 10 nM induisent de la fragmentation de l'ADN dans les lymphocytes humains. Le niveau de fragmentation de l'ADN des lymphocytes humains exposés pendant 2 h à la concentration de 10 nM étaient d'une ampleur similaire après une exposition de 1 h.

Dans une 2^{ème} étude (Murrell et Gibson 2009), un test des comètes *in vitro* a été réalisé sur des cellules Jurkat E6-1 (lignée de lymphocytes humains) après exposition pendant 48 h à 37°C à des BTX à la concentration inhibant la prolifération cellulaire de 50 % (CI₅₀ ; BTX-2 à 5,6 µM, la BTX-3 à 32 µM et BTX-6 à 10 µM). La fragmentation de l'ADN a été quantifiée à l'aide d'un système

⁹ La BTX-2 est métabolisée au niveau hépatique et forme l'époxyde du cycle H (BTX-6).

d'analyse d'images pour au moins 150 cellules/groupe et le paramètre « *Tail moment* » a été calculé. Le potentiel apoptotique a été évalué à l'aide de la méthode YO-PRO/iodure de propidium ainsi que par la mesure des caspases 3/7 et 8. D'après les auteurs, les BTX ont induit des cassures de brins de l'ADN. Il faut noter que les 3 BTX ont induit une augmentation de l'apoptose des cellules Jurkat E6-1 à des concentrations inférieures à celles qui ont amené un test des comètes positif. Un traitement de ces cellules par la BTX-2 (10 µM) pendant 4 h a aussi induit l'expression de gènes d'enzymes de réparation de l'ADN et de facteurs pro-apoptotiques (Murrell et Gibson 2011).

Dans une 3^{ème} étude (Phillips 2009), un test des comètes *in vitro* a été réalisé sur des lignées de cellules épithéliales pulmonaires humaines normales (BEAS-2B) et néoplasiques (H460) exposées pendant 1 h à 37°C à la BTX-3 aux 3 concentrations de 11, 111 et 557 nM. Le test des comètes a été réalisé de façon standard et optimisée (en présence de Fpg, Formamidopyrimidine glycosylase) afin de cibler les dommages oxydatifs de l'ADN. La fragmentation de l'ADN a été quantifiée à l'aide d'un système d'analyse d'images pour environ 150 cellules/concentration et le paramètre « *Tail moment* » a été calculé. Sur les cellules BEAS-2B, le test des comètes standard s'est révélé statistiquement significatif uniquement pour la concentration intermédiaire de 111 nM. En présence de Fpg, aucun effet statistiquement significatif n'a été noté, quelle que soit la concentration. Sur les cellules H460, le test des comètes standard s'est révélé statistiquement significatif uniquement pour la concentration faible de 11 nM. En présence de Fpg, une augmentation statistiquement significative de la fragmentation de l'ADN a été observée à la concentration maximale testée de 557 nM. Par ailleurs, un marqueur associé aux cassures double-brins (test « γ -H2A.X ») a été utilisé parallèlement au test des comètes. Les résultats des pourcentages moyens de cellules présentant une phosphorylation de l'histone H2A.X après exposition à la BTX-3 ne montrent aucune augmentation statistiquement significative, quelle que soit la concentration de BTX-3 et la lignée cellulaire utilisée.

Actuellement, il n'existe pas de ligne directrice concernant le test des comètes *in vitro*. Néanmoins, des recommandations ont été proposées (Tice *et al.* 2000; Hartmann *et al.* 2004). Les études concernant les BTX comprennent de nombreuses déviations à ces recommandations et limites importantes à l'interprétation des résultats (voir Annexe 5). En conclusion, l'ensemble des déviations majeures notées pour ces tests des comètes *in vitro* ne permet ni de valider les résultats ni de cautionner leur interprétation.

Des groupes de rats mâles Fischer F344 ont été exposés par voie intratrachéale à la BTX-2 (45 µg/kg pc) ou à son véhicule sur 3 jours consécutifs. Les foies ont été prélevés 24 h après l'exposition pour analyse de la fragmentation de l'ADN à l'aide d'un test des comètes (Leighfield *et al.* 2009). Les rats traités à la BTX-2 ont montré une augmentation de la quantité d'ADN dans la queue de 2 à 3 fois celle du groupe témoin. Les %*Tail DNA* dans les groupes traités ont été significativement différents de ceux des témoins, pour chaque paire d'animaux. Le protocole utilisé diffère en de très nombreux points de la méthode standardisée du test des comètes *in vivo* (OCDE 2016c) et est entaché de déviations majeures (voir Annexe 5) empêchant toute appréciation de la significativité biologique. De plus, une seule dose a été testée ce qui empêche toute évaluation d'une éventuelle relation dose-effet. L'ensemble de ces déviations ne permet pas de valider les résultats de ce test des comètes *in vivo* et d'endosser son interprétation.

Au cours d'un test de mutagenèse sur un système d'essai bactérien (test d'Ames MPF®) réalisé vis-à-vis des souches de *Salmonella* Typhimurium TA98 et TA100, la BTX-2 à des concentrations de 0,07 à 222 µM n'a pas induit d'augmentation significative du nombre de révertants que ce soit en absence ou en présence d'un système exogène d'activation métabolique (microsomes de foie de rat induits par Aroclor 1254). De même, l'époxyde BTX-6 testé uniquement sans activation métabolique s'est révélé non mutagène dans ce test à des concentrations allant de 0,07 à 222 µM (Leighfield *et al.* 2009). Le test effectué comporte des différences et limites très importantes par rapport à un test d'Ames standard (voir Annexe 5). Les conditions expérimentales de cet essai comportent trop de limites importantes et ne permettent pas de conclure quant au potentiel mutagène des BTX testées sur un système d'essai bactérien.

L'induction d'aberrations chromosomiques par la BTX-2 a été évaluée *in vitro* dans des cellules ovariennes de hamster chinois (cellules CHO-K1-BH4) traitées pendant 48 h exclusivement à l'IC₅₀,

i.e. 100 nM (Sayer *et al.* 2006). Un total de 150 métaphases a été analysé. Selon les auteurs, le groupe traité à la BTX-2 a présenté de nombreuses aberrations chromosomiques avec une augmentation statistiquement significative par rapport au groupe témoin (1,7 % vs 0,09 %). Le protocole utilisé diffère en de nombreux points de la méthode standardisée du test d'aberrations chromosomiques *in vitro* [ligne directrice 476 de l'OCDE (2016a)] et est entaché de déviations tant au niveau du design de l'étude que de l'analyse et l'interprétation des résultats (voir Annexe 5). Dans ces conditions expérimentales, il apparaît impossible de conclure quant au potentiel d'induction d'aberrations chromosomiques *in vitro* de la BTX-2.

Conclusions et recommandations

Les études portant sur la mutagenèse et la génotoxicité de BTX ont mis en évidence des effets significatifs sur différents paramètres par certaines BTX. Cependant, les conditions expérimentales de ces essais comportent de nombreuses et importantes limites méthodologiques et/ou sont entachées de déviations majeures ce qui ne permet pas de valider les résultats ou d'endosser leur interprétation. Il n'apparaît donc pas possible de conclure quant au potentiel mutagène et génotoxique des BTX. Les effets observés vis-à-vis de ces paramètres biologiques représentent tout au plus des « alertes ».

Afin d'obtenir des résultats fiables et consolidés, la stratégie doit être mise en œuvre selon une approche par étapes telle que recommandée par l'EFSA (2011) pour la production et l'évaluation des données sur le potentiel génotoxique et mutagène d'une substance, en commençant par la batterie de base de tests *in vitro* suivante :

- 1) Un test d'Ames (essai de mutation reverse bactérienne) complet utilisant au moins 5 souches bactériennes (*Salmonella typhimurium* TA 1535, TA1537, TA 98, TA 100 et TA102 ou *Escherichia coli* WP2 Pkm101) devrait être réalisé avec et sans activation métabolique, selon les recommandations de la ligne directrice 471 de l'OCDE (1997b). Une attention particulière devra être portée en cas d'un test négatif avec une dose maximale analysable < 250 µg/boîte, qui est la limite de sensibilité estimée pour la plupart des mutagènes pertinents dans le test d'Ames. Dans ce cas, le test d'Ames devra être considéré comme insuffisamment pertinent et le potentiel d'induction de mutation génique devra être évalué sur des cellules de mammifères par exemple à l'aide du test MLA/TK (OCDE 2016d).
- 2) Une étude d'aberrations chromosomiques complète, préférentiellement le test *in vitro* du micronoyau [ligne directrice 487 de l'OCDE (2016b)] tel que recommandé par l'EFSA (2011), devrait être réalisée en utilisant préférentiellement des cellules humaines, stables sur le plan génomique, par exemple des lymphocytes humains. Cette étude devrait être réalisée avec et sans activation métabolique et en utilisant des temps de traitement courts et longs sans activation métabolique, selon les recommandations de la ligne directrice.

La BTX considérée comme la plus pertinente en tant que BTX de référence devant faire l'objet de cette évaluation est la BTX-3. Les autres métabolites majoritaires présents dans les coquillages devraient également être investigués.

4.4 Toxicité *in vivo*

4.4.1 Données toxico-cinétiques

Le caractère lipophile de certaines BTX confère la capacité à franchir la plupart des membranes biologiques. Elles sont rapidement absorbées, distribuées dans tout l'organisme, et franchissent la barrière hémato-méningée (Poli *et al.* 1989; Cattet et Geraci 1993), ainsi que la barrière placentaire (Benson *et al.* 2006).

Après exposition orale chez le rat, la BTX-3 (18,6 µg/kg pc) est assez largement distribuée dans l'organisme, mais se retrouve principalement au niveau du foie (jusqu'à 8 jours après l'exposition Cattet et Geraci (1993)), considéré comme l'acteur majeur du métabolisme de ces toxines. Après

exposition par voie i.v., il apparaît que les muscles squelettiques jouent un rôle de « compartiment de stockage », à partir desquels les BTX sont libérées pendant plusieurs jours avant leur élimination par le foie (Poli *et al.* 1989). La concentration plasmatique suit une cinétique biphasique : en i.v. chez des rats mâles, la BTX-3 tritiée est rapidement distribuée (demi-vie plasmatique de l'ordre de 30 secondes) (Poli *et al.* 1990). Une minute après exposition i.v., 94% de la toxine est distribuée aux organes et après une demi-heure, 70% se retrouve dans la musculature squelettique, 16% dans le foie et 8% dans le tractus digestif. La clairance est lente, car la toxine est retrouvée dans de nombreux organes après plusieurs jours (Cattet et Geraci 1993). Après 6 jours, 89% de la toxine radiomarquée est éliminée dans les fèces et les urines (ratio 5 :1) (Poli *et al.* 1990). L'excrétion se fait donc majoritairement par voie biliaire, mais également par voie urinaire (Poli *et al.* 1989; Poli *et al.* 1990). La métabolisation de la BTX-3 confirme, dans des foies de rats et des hépatocytes, que le foie est l'organe majeur de biotransformation des BTX en plusieurs métabolites (Poli *et al.* 1990).

Par instillation intratrachéale de rats mâles, la BTX-3 tritiée (6,6 µg BTX-3/kg) est retrouvée transitoirement dans les poumons, d'où environ 80% est éliminée en moins d'une demi-heure (Benson *et al.* 1999). Elle est alors largement distribuée dans l'organisme : la moitié dans la musculature squelettique, un tiers dans les intestins et 8% dans le foie. La BTX-3 est également retrouvée, mais en quantités bien moindres, dans le sang, le tissu adipeux et le cerveau. 20% de la toxine est encore présente dans les poumons après 30 minutes. Une part importante de la toxine est éliminée dans les 48 h post-exposition, dans les fèces (60%) et les urines (30%). La BTX-3 reste présente dans l'organisme plusieurs jours après exposition (environ 20% de la dose initiale après 7 jours). De plus, une exposition de rats par inhalation de BTX-3 (237 µg.m⁻³) pendant 5 et 22 jours a montré des dépôts de BTX au niveau du foie (Benson *et al.* 2005a).

Le même type d'étude a été mené chez la souris (Tibbetts *et al.* 2006). La BTX-3 tritiée (2,6 µg/kg) a été administrée par instillation intratrachéale à des souris mâles. Là encore, la toxine se retrouve rapidement dans tous les tissus, en particulier dans le foie et le tractus digestif. Le temps de demi-vie varie de 10 h dans l'estomac, environ 30 h pour le cœur, la graisse, les intestins, les reins et les muscles à 65 h dans le sang et 90 h dans le cerveau et les testicules. La majorité de la toxine (90 %) est excrétée dans les 96 h, *via* les fèces (64 %) et les urines (11 %). Ces résultats confirment donc ceux obtenus chez le rat : l'absorption de la BTX par les voies respiratoires est rapide, sa distribution est ubiquitaire et elle réside pendant plusieurs jours dans l'organisme. Chez des souris exposées à la BTX-3 (400 µg.m⁻³) par inhalation pendant 6 h, la toxine a été retrouvée dans les fèces (Benson *et al.* 2005b).

L'exposition par voie respiratoire, censée reproduire une inhalation humaine de BTX, entraîne donc une exposition systémique à la toxine. Les symptômes tels que l'irritation respiratoire et la bronchoconstriction sont des conséquences globales associées à l'inhalation de BTX.

Chez la tortue d'eau douce (*Trachemys scripta*) et la tortue d'eau salée (*Malaclemys terrapin*), l'instillation intratrachéale de BTX-3 (10,53 µg/kg à une fréquence de trois fois/semaine pendant deux semaines) a permis d'observer des symptômes neurotoxiques caractéristiques des BTX (Cocilova *et al.* 2017). La BTX-3 est retrouvée par ELISA – une heure après exposition à la toxine – dans le cerveau, le poumon, les graisses, l'intestin et le sang pour tous les groupes d'animaux exposés. Une heure après exposition intratrachéale, la BTX-3 atteint un niveau plasmatique de 4,8 µg/L alors que les concentrations hépatique, cérébrale, rénale et trachéale sont de 44,8 ; 30,2 ; 38,6 et 363,3 µg/kg respectivement. La majorité de la toxine a été rapidement éliminée en 24-48 h, ce qui correspond au déclin des symptômes observés. L'excrétion s'est faite surtout par voie hépatobiliaire. Le dosage de la BTX-3 dans les fèces et l'urine a été parallèlement réalisé par LC-MS, et aucun des métabolites recherchés (S-désoxy-BTX-B2 et BTX-B2)– n'a pu être identifié.

L'instillation intratrachéale unique de BTX-3 tritiée (2,8 µg BTX-3/kg) ou en continu par mini-pompe osmotique (7,5 ng/kg/jour pendant 72 h) à des souris gestantes (à 15-18 jours de gestation) a mis en évidence la capacité de la BTX-3 à traverser successivement la barrière sang-air et la barrière placentaire (Benson *et al.* 2006). La BTX-3 tritiée a en effet été retrouvée par dosage de la radioactivité (par scintillation liquide) dans les placentas et les fœtus une demi-heure après exposition. Après 48 h, la dose de toxine fœtale a été estimée à environ 0,3 µg/kg en dose unique

et 0,1 µg/kg après exposition continue. Ces doses, inférieures aux doses de toxines présentes dans la plupart des tissus maternels, confirment le passage placentaire des brevétoxines. Dans la même étude cependant, la BTX-3 n'a pas été retrouvée par LC-MS (LQ de 1 µg/kg) dans les tissus fœtaux.

Selon cette étude, pour une concentration de 1 ng BTX.m⁻³ d'air, une femme enceinte pourrait absorber jusqu'à 5 ng de BTX en 4 h, soit 84 pg/kg de poids corporel (pour une femme de 60 kg). La concentration estimée dans les tissus maternels et fœtaux serait d'environ 84 fg BTX.g⁻¹ de tissu (ou de métabolites de BTX).

4.4.2 Toxicité aiguë chez le rongeur

Quelques études ont cherché à caractériser la toxicité aiguë des BTX. Les voies d'exposition sont le plus souvent intrapéritonéale (i.p.) et intraveineuse (i.v.), rarement orale. Par administration i.v., les effets apparaissent très rapidement ; par administration i.p., les effets apparaissent après 30 minutes et par exposition orale, ils sont visibles après 5 heures (Baden et Mende 1982). Par voie orale, la BTX-2 est moins toxique que la BTX-3, quelle que soit la voie d'administration.

Les BTX induisent des symptômes neurologiques centraux et périphériques, cardiovasculaires, respiratoires : à dose létale, ils se manifestent principalement par des fasciculations musculaires, une ataxie, une exophtalmie, une accélération puis une réduction de la fréquence respiratoire, des troubles de l'activité cardiaque et une réduction de la température corporelle (Baden et Mende 1982) (Selwood *et al.* 2008). A une dose sublétale un ralentissement de la respiration est aussi observé ainsi qu'une diminution transitoire de l'activité. Les souris pour la plupart retrouvent une activité et une apparence normale au bout de 24 h, et retrouvent un poids normal au bout de quelques jours (Selwood *et al.* 2008). Les temps de récupération sont plus lents pour la BTX-3 que pour la S-desoxyBTX-B2. Des signes d'atteinte du système neurovégétatif – salivation, larmoiement, miction et défécation – complètent le tableau neurologique (Tableau 8). Aucune lésion macroscopique n'est observée à la nécropsie.

Tableau 8 : Toxicité aiguë des BTX chez le rongeur

Toxine (pureté)	Espèce	Voie d'administration et n animaux	DL ₅₀	Symptômes	Références
BTX-1 99%	souris (Swiss, mâles et femelles)	ip 5 groupes de 3 animaux	> 100 µg/kg	Non renseigné	(Dechraoui <i>et al.</i> 1999)
BTX-2 (NI)	rat (CD SD), mâles (anesthésie au pentobarbital en ip)	iv n=16	60 µg/kg Dose maximale tolérée = 25 µg/kg	Voir tableau suivant	(Templeton <i>et al.</i> 1989)
BTX-2 (T34) (NI)	souris (Swiss, femelles, jeûne hydrique et alimentaire 16h avant expérimentation)	orale n=5/groupe	6600 µg/kg IC95 : 2900-14800	Mêmes symptômes que BTX-3 mais sans mastication ni hypersalivation. Fasciculations musculaires moins prononcées. A concentrations sub-létales et par voie orale : perte d'appétit et incoordination motrice (2 à 3 jours)	(Baden et Mende 1982)
BTX-2 (NI)		ip n=5/groupe	200 µg/kg IC95 : 150-270		
BTX-2 (NI)		iv n=5/groupe	200 µg/kg IC95 : 170-250		
BTX-3 (T17) (NI)		orale n=5/groupe	520 µg/kg IC95 : 370-730		
BTX-3 (NI)		ip n=5/groupe	170 µg/kg IC95 : 140-210		
BTX-3 (NI)		iv n=5/groupe	94 µg/kg IC95 : 75-116		
BTX-3 99%	souris (Swiss, mâles et femelles)	ip 5 groupes de 3 animaux	> 200 µg/kg	Non renseigné	(Dechraoui <i>et al.</i> 1999)
BTX-3 (NI)	souris (Swiss albino, femelles)	ip selon OCDE 425	250 [176-328] µg/kg	Dose létale : respiration accélérée après l'injection, exophtalmie, mouvements erratiques, ralentissement de la respiration, paralysies du train arrière. Absence de lésions macroscopiques. A doses sublétales, un ralentissement de la respiration est aussi observé ainsi qu'une diminution transitoire de l'activité. Les souris pour la plupart retrouvent une activité et une apparence normale au bout de 24h, et retrouvent un poids normal au bout de quelques jours	(Selwood <i>et al.</i> 2008)
BTX-B2 (NI)	souris (Swiss albino, femelles)	ip selon OCDE 425	400 [400-525] µg/kg	Temps de récupération similaire à celui de la BTX-3 mais plus long qu'avec la S-Desoxybrevetoxin-B2	(Selwood <i>et al.</i> 2008)
S-Desoxybrevetoxin-B2 (NI)	souris (Swiss albino, femelles)	ip selon OCDE 425	211 [200-250] µg/kg	Idem que pour BTX-3 avec un temps de récupération plus rapide	(Selwood <i>et al.</i> 2008)

NI : non indiqué

L'exposition par voie i.p. de souris à la BTX-3 (10 à 300 µg/kg pc) montre des symptômes neurologiques comparables – mastication, convulsions, détresse respiratoire – ainsi qu'une paralysie des membres postérieurs. A la dose de 50 µg/kg, aucun signe d'intoxication n'est visible (Woofter *et al.* 2003). A une dose de 180 µg/kg, la BTX-3 (voie i.p.) induit rapidement une hypothermie périphérique (pattes) et viscérale aiguë associée à une activité motrice fortement réduite (Gordon *et al.* 2001). Il s'ensuit une hyperthermie centrale sur 2-5 jours, sans perte de poids. Dans cette étude, la plus faible dose induisant la mort ou un état moribond est estimée à 187 µg/kg pc.

L'étude de Baden et Mende (1982) est la plus complète car elle propose trois voies d'exposition, dont la voie orale qui correspond chez l'Homme à une exposition alimentaire. Cette étude de toxicité aiguë est conçue pour mettre en évidence un effet toxique cliniquement exprimé et non pour rechercher une dose sans effet (« NOAEL aiguë ») ni une LOAEL.

4.4.3 Toxicité cardiovasculaire

Des travaux entrepris sur d'autres modèles mammifères ont permis de mettre en exergue la toxicité cardiovasculaire et respiratoire – problématique chez l'Homme – associée à une exposition aux BTX. Ces études sur mammifères ont mis en évidence, par exposition i.v. (donc non assimilable à une exposition humaine), des signes cardiovasculaires – bradycardie ou arythmie cardiaque et hypo- ou hyper tension artérielle – ainsi que des symptômes respiratoires (Tableau 9).

Tableau 9 : Toxicité aiguë des BTX chez les mammifères (signes cardiorespiratoires)

Toxine (pureté)	Espèce	Voie	Dose	Symptômes	Références
BTX (pureté non précisée) DL ₅₀ = 2,2 mg/kg (ip souris)	chat	i.v. i.v. i.c.v.	40-80 µg/kg 160 µg/kg	bradycardie, hypotension et bradypnée hypertension et convulsion hypertension et dépression respiratoire	(Borison <i>et al.</i> 1985)
BTX (pureté non précisée) DL ₅₀ = 0,5 mg/kg (ip souris)	chien	i.v.	15-120 µg/kg	fasciculations musculaires, bradycardie, hypotension/hypertension, apnée [effets sur le système nerveux végétatif], sécrétion de catécholamines, arythmie cardiaque, fibrillation ventriculaire (forte dose) et mort	(Johnson <i>et al.</i> 1985)
BTX2 (pureté non précisée) DL ₅₀ = 60 µg/kg (iv rat)	rat (CD, SD, mâles)	i.v.	12,5-100 µg/kg	hypothermie centrale et périphérique, bradypnée arythmie cardiaque pour les doses 25-100 µg/kg	(Templeton <i>et al.</i> 1989)
BTX-3 (T17) et BTX-2 (T34)	cochon d'Inde	i.v.	1 à 200 µg/kg	bronchoconstriction chez l'animal anesthésié et artificiellement ventilé à partir de 20 µg/kg pour la BTX-3 (et seulement à 200 µg/kg pour la BTX-2)	(Baden <i>et al.</i> 1982)

4.4.4 Toxicité par voie respiratoire

Plusieurs études en laboratoire se sont intéressées aux effets d'une exposition par les voies respiratoires chez l'animal, dans le but de reproduire une exposition humaine par aérosols contaminés par les BTX. Cependant, il convient de noter que les protocoles utilisés envisagent des niveaux d'exposition extrêmement variables, en termes de doses, de temps d'exposition (en heures), de fréquences d'exposition (quotidiennes, uniques ou répétées) et de durée (quelques jours à plusieurs semaines). Le Tableau 10 synthétise les résultats d'études de toxicité des BTX par inhalation.

▪ Rongeurs

L'exposition par inhalation de rats mâles à des extraits de *K. brevis* (200 et 1000 µg.L⁻¹) produisant les BTX-2 et BTX-3 (soit 50 et 200 µg eq BTX.m⁻³ pendant quatre heures quotidiennes pendant cinq jours, sur une ou quatre semaines) a révélé un dépôt de BTX dans les poumons (Benson *et al.* 2004). Le dosage a été réalisé par ELISA. Les doses utilisées sont supposément comparables, sinon supérieures, à celles qui peuvent être relevées dans des embruns côtiers. Cette étude précise cependant qu'aux doses utilisées, aucun signe de neurotoxicité, ni altération comportementale, ni déficit respiratoire n'a été observé. Le prélèvement des organes n'a également révélé aucune modification histopathologique des organes (poumons, foie, reins, ganglions lymphatiques, rate et cerveau). La seule modification est un effet immunosuppresseur, par la diminution significative de lymphocytes de la rate.

Des travaux générés par la même équipe (Benson *et al.* 2005a) ont réitéré le même protocole sur rats mâles, en utilisant cette fois la BTX-3. Celle-ci a été inhalée à des doses de 37 ou 237 µg.m⁻³ pendant 2 heures quotidiennes, 5 jours/semaine sur une période de 22 jours, soit environ 0,9 et 5,8 µg/kg/jour. Le poids des rats ayant été exposés à la plus forte dose était inférieur au groupe contrôle après une semaine et les deux groupes de rats avaient un poids inférieur au contrôle après quatre semaines (voir Tableau 10). Aucun signe apparent de toxicité n'est observé, ni aucune lésion histopathologique des organes (museau, cerveau, foie, moelle osseuse). Plusieurs modifications sont relevées, au niveau cellulaire : augmentation du nombre de macrophages des alvéoles pulmonaires, de réticulocytes sanguins (pour le groupe avec la plus forte dose de BTX), diminution de certaines populations de lymphocytes de la rate. Ces données montrent que les BTX affectent le système immunitaire au cours d'une exposition par inhalation.

Parallèlement, chez des souris exposées à des inhalations de BTX-3 (400 µg.m⁻³) pendant deux heures sur une journée ou deux heures et deux heures réparties sur deux jours, aucune toxicité n'est observée, et aucun signe de déficit auditif n'a été rapporté (Benson *et al.* 2005b). Un protocole comparable au précédent a été appliqué sur des souris femelles : exposition par inhalation de deux heures quotidiennes pendant 2 jours consécutifs à la BTX-3 (312 µg.m⁻³ le jour 1 et 278 µg.m⁻³ le jour 2). Ce niveau d'exposition est supposé largement supérieur aux doses présentes dans les aérosols naturels. Après sacrifice, ces souris présentent des dégénérescences neuronales dans le cerveau, au niveau du cortex (cortex cingulaire et rétrosplénial). Aucune mort neuronale n'est observée dans les autres zones du cortex, mais également l'hippocampe, le striatum, le thalamus, l'hypothalamus, et le cervelet (Yan *et al.* 2006). Naturellement, dans ces deux études, les durées d'exposition (2 jours) sont faibles, et probablement non représentatives d'une exposition humaine, sur des zones littorales concernées par les efflorescences de *Karenia*.

Enfin, l'étude de facteurs de comorbidité chez l'animal a été envisagée, pour savoir si certaines populations humaines – présentant des pathologies affectant les voies respiratoires – pouvaient montrer une sensibilité particulière aux BTX dans les aérosols (Benson *et al.* 2011). Chez des rats mâles, des expositions par inhalation de BTX-3 (50 µg.m⁻³ pendant 12 jours) ont été réalisées, conjointement à une instillation intratrachéale du virus de la grippe H3N2 (10⁴ UFP¹⁰/poumon) au

¹⁰ UFP/mL : unité formant plaque par mL

4^{ème} jour. Dans ces conditions, les résultats montrent que les rats exposés à la grippe et à la BTX avaient – au bout d'une semaine – une charge virale plus importante que les animaux seulement exposés au virus, ce qui suggère une moindre capacité à l'élimination du virus chez les animaux intoxiqués avec la BTX-3. Cette observation a été corrélée à une augmentation de cytokines pro-inflammatoires dans ce groupe co-exposé. En conclusion, il apparaît que l'intoxication des voies respiratoires par les BTX pourrait retarder l'immunité anti-infectieuse chez des animaux immunodéprimés au niveau respiratoire.

Tableau 10 : Toxicité des brevétoxines par inhalation chez les rongeurs

Toxines	Espèce Souche/sexe	Doses	Temps d'exposition	Signes/symptômes	Autres marqueurs	Références
Extraits de <i>K. brevis</i> (BTX-2 et -3)	Rat Sprague-Dawley Mâles	50 et 200 µg eq BTX/m ³	4h/jour pendant 5 jours (1 et 4 semaines)	Dépôt de BTX dans les poumons. <u>Pas de signe de toxicité ou de déficit respiratoire</u>	Effet immunosuppresseur. Pas de signe histopathologique.	Benson <i>et al.</i> , 2004
BTX-3	Rat F344 Mâles	0, 37 et 237 µg/m ³ (soit 0,9 et 5,8 µg BTX/kg/jour)	2h/jour, 5 jours/semaine (pendant 5 ou 22 jours)	<u>Pas de signe de toxicité.</u>	Poids inférieur au groupe contrôle. Pas de signe histopathologique.	Benson <i>et al.</i> , 2005a
BTX-3	Souris CBA/CaJ Femelles	400 µg/m ³	2h sur un jour, ou 2h et 4h sur deux jours	<u>Pas de signe de toxicité.</u>	Pas de déficit auditif	Benson <i>et al.</i> , 2005b
BTX-3	Souris BALB/c Femelles	312 µg/m ³ le jour 1 + 278 µg/m ³ le jour 2	2h/jour pendant 2 jours	<u>Pas de signe de toxicité.</u>	Mort neuronale (restreinte au cortex cingulaire et rétrosplénial)	Yan <i>et al.</i> , 2006
BTX-3	Rat F344 Mâles	50 µg/m ³	2h/jour pendant 12 jours. 1 groupes avec le virus de la grippe au 4 ^{ème} jour.		Clairance virale plus lente chez les animaux simultanément infectés au virus et intoxiqués à la BTX. Pas de différence de poids du poumon dans tous les groupes. Augmentation des cytokines pro-inflammatoires.	Benson <i>et al.</i> , 2011

▪ Autres modèles

D'autres modèles vertébrés ont été étudiés, notamment la brebis, à l'aide d'exposition par aérosols. Compte tenu du fait que l'Homme est exposé au niveau des voies respiratoires, et que les asthmatiques sont susceptibles de subir des conséquences plus graves, des modèles d'animaux asthmatiques ont été utilisés. Des brebis, réparties en un groupe normal et allergique (avec asthme) ont été exposées à des aérosols contenant des cultures de *K. brevis*, ou de la BTX-2, ou de la BTX-3 ou de la BTX-2 dépourvue de sa chaîne latérale dite « BTX-2-tbm » (Abraham *et al.* 2005a). Le protocole a utilisé de doses croissantes pour chaque toxine (20 inspirations de : 0,1 ; 0,3 ; 1 ; 3 ou 10 pg/ml de BTX-2, BTX-3 ou BTX-2-tbm, ou 20 inspirations de 0,1 ; 0,3 ou 1 pg eq BTX.mL⁻¹). Les paramètres étudiés ont été la résistance pulmonaire et la clairance mucociliaire (Tableau 11).

Chez les brebis saines et asthmatiques, une bronchoconstriction a été observée pour chaque toxine, de manière dose-dépendante. La BTX-3 et les extraits de *K. brevis* ont induit une diminution de la clairance mucociliaire. Les deux effets observés consécutivement à cette exposition des voies respiratoires montrent que les BTX exercent des effets délétères chez les individus sains, et affectent de manière prononcée des individus avec une pathologie respiratoire. Ces effets ont été confirmés dans une seconde étude de la même équipe (Abraham *et al.* 2005b).

Avec le même protocole, en utilisant uniquement la BTX-3, des brebis saines et asthmatiques ont été exposées à des aérosols (en 20 inspirations consécutives) de 30 ou 300 pg BTX-3/ml (Zaias *et al.* 2011). Elles ont développé une hyperréactivité dose-dépendante des voies aériennes le jour suivant, plus sévère pour le groupe allergique. Parallèlement, les animaux exposés à la plus forte dose de BTX-3 ont développé une réponse inflammatoire, caractérisée par une augmentation des macrophages et des neutrophiles pulmonaires, persistante pendant sept jours. L'inflammation pulmonaire est donc un marqueur de l'exposition des voies respiratoires aux BTX.

Tableau 11 : Toxicité aiguë des BTX chez les brebis

Toxine (pureté)	espèce	voie	dose	symptômes	références
cultures de <i>K. brevis</i>	Brebis saines et asthmatiques	aérosol	Pour les cultures de <i>K. brevis</i> : 0,1, 0,3, et 1 pg eq BTX/ml Pour BTX-2, BTX-3 et BTX-tbm : 0,1; 0,3; 1; 3; 10 pg/ml (x20 inspirations)	Augmentation dose-dépendante de la résistance pulmonaire (effet broncho-constricteur) + réduction de la clairance mucociliaire	(Abraham <i>et al.</i> 2005a)
BTX-2 (NI)					
BTX-3 (NI)					
BTX-tbm =BTX sans chaîne latérale 2 (NI)					
BTX-3		aérosol	30 ou 300 pg BTX-3/mL	Augmentation dose-dépendante de l'hyperactivité des voies aériennes notamment pour le groupe allergique	(Zaias <i>et al.</i> 2011)

NI : non indiquée

Chez les tortues (*Trachemys scripta* et *Malaclemys terrapin*) exposées par instillation intratrachéale à la BTX-3, trois fois/semaine pendant deux semaines, les symptômes sont principalement neurotoxiques et dose-dépendants (Tableau 12) (Cocilova *et al.*, 2017). Les symptômes musculaires et neurologiques correspondant à une intoxication aux BTX sont observés : balancement de la tête, fasciculations, ataxie, nage circulaire, paralysie musculaire, prolapsus pénien chez les mâles (descente d'organe), œdème et dans certains cas un coma apparent. L'apparition des symptômes – 2 à 5 minutes – est beaucoup plus rapide que par voie orale (environ 30 minutes). Ces symptômes sont observés toutes les heures pendant les huit premières heures suivant chaque exposition, puis quotidiennement. Ils s'estompent sur une période de 24 heures. Un état léthargique est le symptôme qui persiste pendant plus de 24-48 heures, ainsi que la diminution de l'appétit pendant toute la durée de l'expérience. Une inflammation des voies respiratoires (trachée et poumons) a été observée.

Tableau 12 : Effets de la BTX-3 par voie intratrachéale chez la tortue d'eau douce *Trachemys scripta*. Les symptômes ont été observés dans les minutes suivant l'exposition. (d'après Cocilova *et al.*, 2017)

Dose de BTX-3 ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Symptômes
3,12	Aucun. Réaction normale au toucher
4,68	Réaction normale au toucher. Mouvements légers dans l'aquarium
7,02	Motricité réduite, légères contractions musculaires, légers mouvements de la tête.
10,53	Contractions musculaires, nage circulaire, vacillement de la tête, paralysie partielle ou complète, ataxie.
13,16	Coma, mort

4.4.4.1 Toxicité chronique

La survenue d'effets retardés ou de séquelles à la suite d'une exposition aiguë a été discutée par le GT, ainsi que la possibilité d'effets à long terme d'une exposition répétée à des doses faibles (toxicité chronique). Cependant, le GT n'a identifié aucune étude dans la littérature abordant ces aspects. Ceux-ci devraient être considérés compte tenu de la similitude entre les brevétoxines et les ciguatoxines, des neurotoxines responsables de la ciguatera dont les effets perdurent pendant des mois voire des années après une exposition aiguë.

4.4.4.2 Toxicité sur la reproduction et le développement

Aucune information n'a été identifiée par le GT concernant le potentiel toxique des BTX sur la reproduction et le développement. Le passage placentaire a été étudié chez la souris avec la BTX-3 radiomarquée par instillation intratrachéale (d'après Benson *et al.* (2006), voir la section 4.4.1 Données de toxicocinétique), ce qui pourrait suggérer un risque d'exposition du fœtus.

Deux études développementales sur le poisson medaka après micro-injection de la BTX-1 (0,1 à 8,0 ng/œuf) et de la BTX-3 au stade œuf (Kimm-Brinson et Ramsdell 2001; Colman et Ramsdell 2003) ont montré un taux de succès d'éclosion diminué, un effet léthal sur les larves et des anomalies développementales (hyperkinésie, courbure de la colonne vertébrale, hernie des méninges cérébrales, défaut de position de l'œil). Les réponses cardiovasculaires chez les embryons étaient une tachycardie persistante après exposition à la BTX-3 et une bradycardie tardive après exposition à la BTX-1 (Voir également la section 4.6.3 Toxicité sur les poissons).

4.4.5 Conclusions et recommandations

- Les BTX induisent des symptômes neurologiques et musculaires, quelle que soit la voie d'exposition (orale, i.v. ou i.p.) chez l'animal. Ces effets sont principalement des fasciculations musculaires, une rigidité caudale, la perte d'appétit, une incoordination motrice, des convulsions, des effets végétatifs (salivation, larmolement, miction et défécation), une hypothermie précoce suivie d'une hyperthermie tardive, et une détresse respiratoire par bronchoconstriction. Ils s'accompagnent d'effets sévères sur le système cardiovasculaire : bradycardie, hypotension et hypertension artérielle, et bradypnée.
- L'effet des BTX doit faire l'objet d'une étude de toxicité orale aiguë selon la ligne directrice 424 de l'OCDE pour l'étude de la neurotoxicité (administration unique, période d'observation de 14 jours), chez le rongeur, permettant la description de l'ensemble des symptômes cliniques visibles, l'évaluation la plus complète possible de paramètres biologiques (paramètres respiratoires et cardiovasculaires, suivi de la température interne, effets gastro-intestinaux) pour déterminer la relation dose-effet (OCDE 1997a). Une telle étude permettra de définir un effet critique aigu, et d'identifier une dose sans effet. Cette recommandation s'applique prioritairement à la BTX-3, et dans un second temps aux autres BTX majoritaires dans les coquillages.
- Des études de toxicité subaiguë/subchronique doivent également être envisagées pour identifier une dose sans effet permettant de caractériser le danger pour l'Homme dans le cadre d'expositions répétées à des doses infra-cliniques. Elles seront réalisées par administration orale répétée, de 28 ou 90 jours chez le rongeur selon les lignes directrices 424, 407 ou 408 de l'OCDE (OCDE 1997a, 2008, 2018a). Cette recommandation s'applique prioritairement à la BTX-3, et dans un second temps aux autres BTX majoritaires dans les coquillages. La toxicité chronique des BTX doit également être considérée dans des études chez les rongeurs.
- Le caractère toxique des brevétoxines pour le développement et le neuro-développement doit faire l'objet d'une étude visant à identifier les conséquences d'une exposition de femelles gestantes aux brevétoxines par voie orale sur sa descendance (lignes directrices de l'OCDE 414 et 426 (OCDE 2007, 2018b)).
- Des études comparables devraient être menées par exposition aux BTX par voie respiratoire.

4.5 Toxicité chez l'Homme

L'Homme peut être exposé aux brevétoxines par voie alimentaire, par inhalation et par contact. Les symptômes associés à une exposition aux BTX ainsi que leur durée dépendent en partie de ces voies d'exposition. Une revue systématique de la littérature réalisée par (Young *et al.* 2020) a répertorié les études s'intéressant aux effets sanitaires chez l'Homme associés aux efflorescences de microalgues marines et leurs toxines (publications en anglais, de 1985 à 2019). Les travaux relatifs aux BTX représentent 7,9 % des publications (30/380 publications) : 15 publications concernent des données épidémiologiques liés aux expositions par aérosols, 7 publications rapportant des cas d'intoxication par inhalation ou ingestion de coquillages (6 aux Etats-Unis et 1 cas groupé en Nouvelle-Zélande), 5 études auxiliaires sur l'identification des toxines impliquées et 3 études de surveillance et de données écologiques d'association entre les niveaux de contamination du milieu et des symptômes diarrhéiques.

4.5.1 Exposition par ingestion : « Neurotoxic Shellfish Poisoning »

Le syndrome nommé « Neurotoxic Shellfish Poisoning » (NSP, intoxication neurologique par fruits de mer) désigne l'intoxication liée à l'ingestion de coquillages contaminés par des BTX. Les symptômes débutent généralement entre 1 h et 24 h après l'exposition, et peuvent persister jusqu'à 3 jours. Le syndrome NSP se caractérise principalement par l'apparition de symptômes digestifs et neurologiques (Watkins *et al.* 2008). Plus précisément, les signes digestifs incluent des douleurs abdominales, nausées, vomissements et diarrhées. Les signes neurologiques comprennent essentiellement des paresthésies (lèvres et extrémité des membres), des vertiges, une asthénie, ainsi qu'une paralysie partielle des membres, des troubles de l'élocution, une perte de coordination et un coma dans les cas les plus graves. Une inversion de la sensation de température, une mydriase ainsi que des troubles cardio-vasculaires (bradycardie, hypotension artérielle) ont également été rapportés. Aucun cas de décès n'a été rapporté à ce jour.

4.5.1.1 Définition d'un cas

Aux USA, les Centres de contrôle et de prévention des maladies (« *Center for Disease Control and Prevention* ») définissent plusieurs niveaux de preuve d'intoxication par NST (Neurotoxic Shellfish Toxins) :

- **Cas confirmé** : Tableau clinique évoquant une intoxication NSP et identification de la toxine dans les aliments ou dans les échantillons biologiques du patient, ou confirmation d'une efflorescence de *Karenia brevis* dans la zone géographique.
- **Cas probable** : Tableau clinique compatible, avec un index élevé de suspicion d'exposition aux BTX (consommation de coquillages, localisations, périodes...), ou existence d'un lien épidémiologique entre le cas et un autre cas confirmé.
- **Cas suspect** : Cas potentiellement exposé mais pas de lien évident identifié.

Il n'existe pas d'antidote des BTX, le traitement est symptomatique. Les patients présentant des symptômes gastro-intestinaux bénins peuvent être pris en charge à domicile. En revanche, les patients présentant des symptômes neurologiques centraux ou cardiologiques doivent faire l'objet d'une hospitalisation et d'une surveillance médicale. Dans les cas les plus graves, une intubation / ventilation peut être nécessaire plusieurs jours dans un service de soins intensifs ou de réanimation.

En Australie, dans l'Etat de Nouvelle-Galles du Sud (*New South Wales*), la définition des cas est la suivante (Victorian Fisheries Authority 2016) :

- **Cas confirmé** : Conforme à la définition de cas clinique et détection des toxines NSP dans les restes de coquillages à un niveau entraînant la consommation d'une dose susceptible de provoquer des symptômes (niveau actuel : **0,3 US/kg de poids corporel**¹¹).
- **Cas probable** : Conforme à la définition de cas clinique et dans les 7 jours suivant la collecte des coquillages consommés par le cas, les biotoxines NSP ont été détectées à ou au-dessus de la limite réglementaire (actuellement 20 US/100 g de coquillages) dans les coquillages obtenus à proximité ou sur le même site (pas de restes).
- **Cas suspect (*clinical case definition*)** : Au moins deux des symptômes neurologiques suivants survenant dans les 24 heures suivant la consommation de coquillages :
 - Neurosensoriel :
 - Paresthésie, c'est-à-dire engourdissement ou picotements autour de la bouche, du visage ou des extrémités
 - Alternance de sensations de température comme une sensation de picotement sur la peau pendant un bain / douche ou une exposition au soleil, ou difficulté à distinguer le chaud ou le froid des objets
 - Neuromoteur / neurocérébelleux :
 - Faiblesse telle que difficulté à se lever du siège ou du lit
 - Difficulté à avaler
 - Difficulté à respirer
 - Paralysie
 - Maladresse
 - Marche instable
 - Étourdissements / vertiges
 - Discours trouble / flou
 - Vision double.

4.5.1.2 Données épidémiologiques, principaux symptômes et études clés

Les données de la littérature comportent peu de cas d'intoxications humaines liées à la consommation de coquillages contaminés par les BTX. Quelques centaines de cas ont été décrits dans des revues internationales à comité de lecture, dont 48 cas (survenus sur quelques semaines en Caroline du Nord) proviennent d'une seule publication (Morris *et al.* 1991). En Nouvelle-Zélande, 180 cas ont été déclarés entre 1992 et 1993 en lien avec la consommation de moules, palourdes et huîtres (MacKenzie *et al.* 1995; Morohashi *et al.* 1995; Ishida *et al.* 1996; Morohashi *et al.* 1999; Todd 2002; Ishida *et al.* 2004a). Entre 1997 et 2010, les cas d'intoxication ont été rares aux Etats Unis, avec seulement 21 cas de NSP rapportés, dont 20 (le 21^{ème} restant inconnu) concernent des intoxications liées à une pêche récréative pendant un épisode de marée rouge¹².

Le faible nombre de ces événements peut être expliqué par la mise en place d'une réglementation relative à la commercialisation des coquillages via une surveillance de la présence des cellules de *K. brevis* le long des côtes américaines du Golfe du Mexique, ainsi qu'en Nouvelle-Zélande. Les NSP restent malgré tout sous-estimées, y compris en Floride où cette intoxication est pourtant à déclaration obligatoire. De plus, la communication semble insuffisante concernant la pratique de la pêche à pied récréative. Dans l'étude rétrospective menée par Reich *et al.* (2015) des cas déclarés en Floride entre 2004 et 2009, 78% des cas étaient survenus chez des non-résidents (des touristes) ou des résidents de Floride mais ne vivant pas le long de la côte.

Des cas d'intoxication humaine liés à la consommation de coquillages contaminés par des BTX sont survenus au Mexique mais ne sont pas décrits dans une publication scientifique en langue anglaise.

¹¹ US : unité souris, voir paragraphe 2.3.3.1.

¹² <http://www.floridahealth.gov/diseases-and-conditions/disease-reporting-and-management/disease-reporting-and-surveillance/documents/gsi-neurotoxic-shellfish.pdf>

Dix-neuf cas de NSP ont été réportés suite à l'ingestion d'huîtres ou palourdes de Floride en 1962 et 1963 (McFarren *et al.* 1965). Dans 14 cas, la quantité de coquillages ingérée et la toxicité des restes des repas incriminés, quantifiée par le bio-essai souris, étaient renseignées. Ces données ont pu être exploitées par le GT pour identifier des doses minimales associées à des symptômes (voir la section 5. Caractérisation du danger). Les coquillages impliqués avaient un niveau de BTX estimé à 135, 100 et 65 US/100 g de chair. Les signes présentés par 4 cas sont bien détaillés. Après ingestion de quelques huîtres, aucun signe n'a été ressenti spontanément. Cependant, des paresthésies orales ont été déclenchées par l'ingestion d'une boisson froide (milk shake) chez une personne ayant consommé 2-3 huîtres. Ces 4 cas ont ensuite chacun consommé un total de 15-20 huîtres cuites et tous ont ressenti 1 à 3 h après ingestion des paresthésies orales, distales et/ou généralisées, ainsi qu'une sensation d'ébriété et de froid. Certains ont aussi présenté une diarrhée accompagnée de douleurs rectales, une anomalie de la perception de la température de boisson, ou encore bradycardie et mydriase. Le 5^{ème} cas, dont l'exposition aux BTX a été estimée à 48-60 huîtres crues, a présenté 3 h après ingestion des paresthésies orales et distales, vertiges, nausées, ataxie, bradycardie et diarrhée. Les autres cas ont présenté des signes décrits comme similaires. Tous les signes ont disparu en 24 à 48 h.

En 1973 et 1974, un épisode de marée rouge (« *red tide* » en anglais) en Floride a entraîné trois séries d'intoxications NSP, pour un total de 11 personnes intoxiquées (Hemmert 1975). Le 1^{er} épisode s'est produit en novembre 1973, avec la consommation de palourdes (*Spisula solidissima raveneli*) près de Sarasota (Floride) par 2 enfants de 10 et 12 ans. Peu après l'ingestion des coquillages, les 2 enfants ont présenté des douleurs abdominales, des paresthésies des membres et des céphalées. L'état de santé de l'enfant le plus jeune s'est rapidement dégradé (crises convulsives), évoluant vers un coma et enfin un arrêt respiratoire ayant nécessité une prise en charge réanimatoire incluant une intubation associée à une ventilation mécanique. Au cours du même mois, 5 adultes ont consommé des « *quahog* » (palourde américaine *Mercenaria campechianensis*) ramassés dans la même zone et 3 d'entre eux ont présenté des symptômes typiques bénins de NSP, ayant entraîné l'hospitalisation pour l'un d'entre eux. Enfin, un 3^{ème} épisode d'intoxication collective s'est produit, toujours en Floride, chez 4 adultes. Les symptômes étaient bénins chez 3 d'entre eux, et modérés mais d'imputabilité douteuse chez le 4^{ème}. Les analyses de coquillages ont montré une contamination à hauteur de 75 à 118 US/100 g. Les auteurs ont estimé une « LOAEL aiguë » (dose minimale avec effets néfastes) de 0,3-0,4 US/kg p.c.

Dans l'étude publiée par Morris *et al.* (1991), les symptômes les plus répandus étaient : paresthésie (81 %), vertige (61 %), malaise (50 %), douleur abdominale (48 %), nausées (44 %), diarrhées (33 %), faiblesse motrice (31 %) et ataxie (27 %). De façon surprenante, 17% des patients ont rapporté une inversion de la perception de température, un symptôme non communément rapporté dans les autres événements d'intoxication ayant eu lieu en Floride, et qui sont plus généralement associés à une intoxication de type ciguatera. Le temps moyen d'apparition des symptômes était de 3 h (intervalle de 15 min à 18 h) et l'intensité des symptômes a été associée à la quantité de coquillages ingérées. Presque tous les patients ont eu plusieurs symptômes, et la plupart ont eu plus d'un symptôme neurologique. Seulement un patient a été admis à l'hôpital car présentant des signes neurologiques graves : tremblement carpopédal bilatéral, myalgies, paresthésies, ataxie, et vertige. Il n'y a eu aucun cas de détresse respiratoire. La durée moyenne des symptômes était de 17 h (intervalle 1-72 h). Cette série de cas représente la meilleure description clinique et épidémiologique d'une intoxication par les BTX rapportée dans la littérature. Au cours de cet épisode, les huîtres impliquées avaient un niveau de toxine de 35 et 60 US par 100 g de tissus. Deux personnes sur 15 ayant consommé moins de 12 huîtres ont présenté des symptômes (taux d'attaque de 13% dans ce groupe de consommateurs). Pour une consommation de 12 huîtres et plus, le taux d'attaque était de 65 % (45/69 personnes). En utilisant 12 huîtres dans le calcul (seuil entraînant des symptômes chez une faible proportion de personnes), et en supposant un poids de 10 g par huître, Gessner (2000) propose une estimation de la dose toxique entraînant des symptômes bénins se situant entre à 42 et 72 US/personne. Cette valeur est souvent reprise dans les travaux de revue mais elle est très incertaine (voir la section 5. Caractérisation du danger).

Bien que l'efflorescence en Caroline du Nord ait été importante en termes de nombre de cas d'intoxication, il y a eu peu d'hospitalisations et, dans l'ensemble, peu de symptômes graves. En revanche, il a été documenté ces dernières années en Floride des cas cliniques très sévères de NSP. En 2005, quatre personnes ont été admises dans des hôpitaux et ont reçu un diagnostic de NSP après un repas d'huîtres récoltées dans une zone qui a ensuite été fermée en raison du nombre élevé de cellules de *K. brevis*. Deux des cas étaient des enfants (6 et 9 ans), dont le plus jeune a présenté des épisodes de convulsions. Son état clinique a nécessité une intubation associée à une ventilation mécanique dans une unité de soins intensifs. Les autres symptômes rapportés étaient des spasmes et des crampes musculaires involontaires (l'ensemble des cas), des crampes abdominales, et une paresthésie au niveau du visage et des extrémités des membres (rapportée pour 3 des 4 cas), et des vomissements et des céphalées (pour 2 des 4 cas). Le délai d'incubation a été rapide, et les enfants ont été plus gravement touchés que les adultes (Terzagian 2006; Watkins *et al.*, 2008).

Un autre événement grave s'est produit lorsqu'une famille de trois personnes a été intoxiquée en juin 1996 après la consommation de gastéropodes et mollusques (bulots et palourdes) récoltés dans la baie de Sarasota (Floride) (Poli *et al.* 2000). C'était la première intoxication documentée associée à la consommation de bulots. Un des parents a éprouvé des paresthésies au niveau du visage et des extrémités des membres, ainsi que des vomissements. Les deux jeunes enfants (âgés de 2 et 3 ans) ont été hospitalisés avec des signes et des symptômes neurologiques graves (convulsions, perte de conscience), une dyspnée et une tachycardie. Des vomissements et des douleurs abdominales étaient également présents. Les deux enfants ont été placés dans l'unité de soins intensifs ; le rétablissement s'est produit en quelques jours, mais aucun suivi à long terme n'a été effectué. Les BTX ont été identifiées dans l'urine des enfants par méthode RIA (42 [±2] ng/ml BTX, et 117 [± 30] ng/ml pour le deuxième enfant). Des BTX ont également été détectées par RIA dans des extraits de mollusques et gastéropodes ingérés (Poli *et al.* 2000; Terzagian 2006). Le père a déclaré avoir mangé plusieurs bulots, et les enfants ont ingéré des quantités inconnues mais probablement plus faibles.

Toujours en Floride, 4 personnes (2 adultes de 31 et 34 ans, 2 enfants de 6 et 9 ans) ont été intoxiquées après avoir consommé des palourdes qu'ils avaient récoltées. Tous ont été hospitalisés mais les symptômes ne sont pas décrits (Reich *et al.* 2015).

Plus récemment dans le sud-ouest de la Floride, en 2006 au cours d'une efflorescence prolongée de *K. brevis*, 20 cas ont été signalés aux autorités sanitaires de la Floride. Les cas de NSP sont apparus de mars à décembre 2006 de façon sporadique, la majorité ayant été enregistrée en juillet 2006 liés à la consommation de palourdes récoltées en pêche à pied récréative sauf un cas lié à la consommation de conches (un gastéropode) (Terzagian 2006; Watkins *et al.* 2008; Reich *et al.* 2015). Les symptômes de cet épisode de 2006 en Floride semblaient être de gravité supérieure à celle rapportée lors de l'épisode de 1997 en Caroline du Nord. Les données du registre des maladies de la Floride, du *Florida Poison Information System* et des questionnaires par téléphone ont été utilisées pour obtenir des données cliniques et démographiques pour les cas. Tous les cas de la Floride ont rapporté de multiples symptômes (entre 5 et 17), y compris des symptômes neurologiques. Les symptômes les plus courants (n=20) signalés étaient des paresthésies dans les lèvres et la bouche (90 %), des paresthésies dans les extrémités (90 %), des nausées (80 %), une faiblesse musculaire (80 %), des vomissements (65 %), une ataxie (65 %), des troubles de l'élocution (55 %), des étourdissements (50 %), et des difficultés respiratoires (35 %). La diarrhée, la fatigue, la douleur, les contractions musculaires, les maux de tête, les crampes, la paralysie partielle et les effets neurologiques graves ont été signalés dans une moindre mesure (dans 20 à 30% des cas). Des douleurs thoraciques, un flou visuel, une hypersudation, une détresse respiratoire, une tachycardie et une hyperthermie ont rarement été signalés (dans 10 % ou moins des cas). 17 des 20 personnes ont nécessité une prise en charge médicale dans les services d'urgence locaux, dont 7 (41 %) ont été admis à l'hôpital. Une personne avec des comorbidités a été placée sous assistance ventilatoire pendant 3 jours. Une autre personne a été placée dans l'unité de soins intensifs pendant une courte période avec des symptômes neurologiques graves. En plus des symptômes les plus courants mentionnés ci-dessus, certaines personnes ont signalé des spasmes, des fasciculations musculaires et des signes psychotiques (non précisés, n = 6). Un seul

cas dans cette série de la Floride a rapporté une inversion de la perception de température. Les différences dans les symptômes rapportés entre la Floride et les épisodes de Caroline du Nord peuvent être dues, en partie, aux variations dans les méthodes utilisées pour documenter les symptômes et au décalage de temps entre la maladie et la visite médicale pour certains des cas rapportés tardivement en Floride. Les variations dans la composition du mélange de BTX entre ces deux événements d'efflorescence peuvent également être responsables des différences de symptômes, bien que cette théorie ne puisse pas être testée rétrospectivement.

Des restes de repas (palourdes) étaient disponibles pour des tests à partir de quelques-uns de ces cas de 2006 en Floride. Le total des BTX était de 42,9 mg/kg et de 24 mg/kg (ELISA) dans un groupe, bien au-dessus du niveau réglementaire de 800 µg/kg. L'analyse des palourdes récoltées dans la même zone que les palourdes impliquées a montré qu'elles étaient également contaminées (23,6 mg/kg par ELISA).

Zhang *et al.* (2015) ont rapporté que les concentrations de BTX (inférieures aux valeurs limites de 800 µg/kg) dans la région de Ningbo en Chine étaient corrélées de façon significative au nombre de cas de diarrhées d'origine alimentaire (Zhang *et al.* 2015).

Enfin, en mars 2017, 2 personnes ont été admises aux urgences en Floride suite à la consommation de gastéropodes (« *horse conch* » *Triplofusus giganteus*) prélevés dans une zone impactée par une efflorescence prolongée de *K. brevis* de septembre 2016 à février 2017 (Abraham *et al.* 2021). En mars 2017, *K. brevis* n'était pas présente ou était présente à de faibles niveaux (<10 000 cellules/L), mais la zone était restée fermée pour la récolte de bivalves. Les gastéropodes ont été consommés cuits (bouillis dans l'eau 45 minutes). Les symptômes sont apparus entre 4 et 6 h après ingestion et ont perduré entre 24 et 34 h. Les patients ont présenté une faiblesse généralisée, une fatigue inhabituelle, un engourdissement corporel, des étourdissements, une inversion de la perception de température chaud/froid, des paresthésies, des nausées, des vertiges et une ataxie. Il n'y avait pas de reste de repas pour pouvoir analyser la concentration en BTX. Des échantillons de bivalves et de gastéropodes ont été prélevés sur le même site une semaine après les cas de NSP. Les concentrations mesurées par ELISA allaient de 1,1 à 198 mg eq. BTX-3/kg de tissu (chair ou viscères). Par LC-MS, les métabolites BTX-B1, BTX-B2, S-désoxyBTX-B2, BTX-B5, BTX-2 et BTX-3 ont été recherchés et les concentrations mesurées étaient beaucoup faibles (maximum à 58 mg/kg pour la somme des métabolites) Les urines des patients ont été analysées et la présence de BTX a été confirmée par ELISA et LC-MS.

Plus de 10 symptômes, principalement gastro-intestinaux, neurologiques et cardiovasculaires, peuvent être associés à une intoxication alimentaire par les BTX (tableau 13). La plupart des symptômes observés chez l'Homme sont les conséquences des effets délétères des BTX sur le système nerveux central et périphérique.

Tableau 13 : Synthèse des symptômes associés à une intoxication alimentaire par les BTX

Symptômes	Floride 1962 n = 5 McFarren <i>et al.</i> 1965	Floride 1973- 74, n = 11 Hemmert 1975	Caroline du Nord 1987, n = 48 Morris <i>et al.</i> 1991	Floride 1996 n = 3 Poli <i>et al.</i> 2000	Floride 2006 n = 20 Watkins <i>et al.</i> 2008
Douleurs abdominales		45 %	48 %	x	
Douleurs (non précisées)					20-30 %
Nausées	20 %		44 %	x	80 %
Diarrhées	60 %		33 %		20-30 %
Vomissements			10 %	x	65 %
Paresthésie ¹	100 %	55 %	81 %	x	90 %
Dysesthésie ²	40 %		17 %		5 %
Sensation de froid	40 %				
Sensation ébrieuse	40 %				
Irritation rectale	20 %				
Myalgies ³			13 %		
Vertiges	80 %	36 %	60 %		50 %
Ataxie ⁴	40 %		27 %		65 %
Tremblements			6 %		
Faiblesse musculaire					80 %
Fasciculations musculaires		9 %			20-30 %
Crampes musculaires					20-30 %
Asthénie			31 %	x	20-30%
Malaise			50 %		
Frissons			21 %		
Céphalées		9 %	15 %		20-30%
Mydriase ⁵	80 %				
Vision trouble					≤10%
Bradycardie	40 %				
Troubles de l'élocution					55%
Paralysies partielles		9 %			20-30 %
Gêne respiratoire					35 %
Douleurs thoraciques					≤ 10 %
Hypersudation					≤ 10 %
Fièvre					≤ 10 %
Dyspnée		9 %		x	≤ 10 %
Tachycardie				x	≤ 10 %
Perte de connaissance				x	
Convulsions		9 %		x	
Epilepsie				x	
Neurologique sévère		9 % (coma)			5 %

Floride 1996 (Poli *et al.* 2000) apparence des symptômes non numérisée car 2 patients sont des enfants de 2 et 3 ans. Rouge : symptômes sévères ; Vert : symptômes dès les cas légers.

¹ Paresthésie péri-orale et aux extrémités, parfois gorge, visage et tout le corps : fourmillement, brulures, engourdissements, picotements

² Dysesthésie : inversion de la perception de température

³ Myalgie : douleur musculaire

⁴ Ataxie : troubles de la coordination

⁵ Mydriase : dilatation des pupilles

Dans certains cas en Floride des symptômes cardiovasculaires et neurologiques additionnels sont observés : hypotension, troubles de l'élocution, paralysies partielles, stress respiratoire (McFarren *et al.* 1965; Watkins *et al.* 2008). Les délais tendent aussi à être moins longs et moins souvent associés à des vertiges et de la nausée. Les symptômes de malaise, frissons et fatigue musculaire ne sont au contraire pas observés en Floride. Ces différences peuvent résulter de différences quantitatives et qualitatives (potentiellement la présence de toxines à action plus lente (Morris *et al.* 1991) des toxines consommées mais aussi d'une observation plus rigoureuse des cas de sévérité moyenne (Gessner 2000) ou de méthodologies différentes de documentation de symptômes et le temps passé entre le début des symptômes et les interviews (Morris *et al.* 1991).

Les symptômes les plus fréquents sont des paresthésies des extrémités des membres et péri-orales, observées dans les cas les plus bénins : picotements ressentis après la consommation de seulement 2-3 huîtres (McFarren *et al.* 1965). Dans des cas sévères (observés chez de jeunes enfants), ont été décrits une perte de connaissance, des convulsions, de la tachycardie, de la tachypnée. Une assistance respiratoire a été mise en place et les enfants ont été gardés sous surveillance médicale pendant 2 à 3 jours (Poli *et al.* 2000).

4.5.1.3 Toxicité chronique, toxicité sur la reproduction et le développement

Le GT n'a identifié aucune étude dans la littérature abordant les aspects liés à une exposition chronique aux BTX ou à des effets retardés ou à long terme (séquelles) suite à une exposition aiguë. Les informations sont également manquantes concernant le potentiel toxique des BTX sur la reproduction et le développement.

4.5.1.4 Données de toxico-cinétique chez l'Homme

Très peu de données toxico-cinétiques sont disponibles chez l'Homme. Les seules informations sont issues de dosage urinaire des brevétoxines dans les heures qui ont suivi l'ingestion de coquillages contaminés par les brevétoxines mais sont absents dans les échantillons 3-4 jours après l'ingestion (Poli *et al.* 2000; Terzagian 2006). Cette mesure peut être utilisée pour confirmer un cas d'intoxication, à condition d'être réalisée rapidement après ingestion. Abraham *et al.* (2008) et Abraham *et al.* (2021) ont rapporté la présence dans les urines de cas NSP de BTX-3, BTX-B5, 27-époxy-BTX3 et méthylsulfoxy-BTX-3. Par ELISA, les concentrations mesurées allaient de 4 à 180 ng eq. BTX-3/mL.

4.5.2 Exposition par inhalation

L'exposition aux aérosols ne se limitent pas aux zones d'eau de mer contaminées par les efflorescences. Les aérosols peuvent être transportés sur une longue distance (4-5 km). Cependant, plus l'aérosol est éloigné de l'efflorescence plus la concentration en brevétoxines dans ce dernier est faible. La BTX-3 semble être la toxine responsable des irritations respiratoires (Baden *et al.* 1982 a et b cités dans Kirkpatrick *et al.* 2004).

Les effets des embruns chargés en BTX sont fréquemment rapportés en Amérique du Nord, sur la côte orientale, Floride et Golfe du Mexique. Plusieurs études décrivent les symptômes observés : éternuements, rhinorrhée et irritation de la gorge (Milian *et al.* 2007 ; Fleming *et al.* 2005a, 2007b, 2009 ; Cheng *et al.* 2004, 2005a, 2005b; Pierce *et al.* 2003, 2005, 2008). Les symptômes apparaissent quelques minutes à quelques heures (< 24 h) après l'exposition. Cette localisation anatomique des symptômes suggère un dépôt de BTX dans les voies aériennes supérieures. Ils se déplacent des parties supérieures vers les parties inférieures de l'arbre respiratoire et s'accroissent en fonction de l'augmentation de la concentration en brevétoxines dans l'air (Backer *et al.* 2003).

De faibles concentrations atmosphériques en brevétoxines, de l'ordre de 3 à 4 ng.m⁻³ suffisent à déclencher des effets sur les voies aériennes supérieures ou oculaires (Backer *et al.* 2003 ; Cheng *et al.* 2005 a et b).

Les différents travaux de recherche menés sur les plages de Floride ont permis de caractériser les particules des aérosols formés durant les efflorescences de *K. brevis*. Ces dernières ont en général une taille de l'ordre de 8 à 9 µm, taille suffisante pour que le dépôt des brevétoxines dans les voies aériennes supérieures soient possibles (Cheng *et al.* 2005 a et b). Les études montrent que 10 à 20% des particules contenant des brevétoxines peuvent pénétrer les poumons humains (Cheng *et al.* 2004, 2005a, 2005b; Pierce *et al.* 2003; 2005; 2008). Cependant seulement 2 à 6% de ces particules sont suffisamment petites (< 5 µm) pour atteindre les voies respiratoires inférieures ce qui expliquerait le fait que les symptômes associés à la présence d'efflorescence de *K. brevis* ne touchent que les voies respiratoires supérieures (Cheng *et al.* 2005).

Les aérosols contaminés par des brevétoxines peuvent également se déposer sur le visage et la peau et causer des irritations cutanées et oculaires (Kirkpatrick *et al.* 2004). Cependant, les auteurs ne précisent pas si les irritations proviennent des brevétoxines ou des sels marins. L'exposition par contact cutané est une voie d'exposition très peu étudiée jusqu'à présent.

Une étude expérimentale chez l'Homme rend compte des effets des brevétoxines sur la santé humaine (Fleming *et al.* 2009) : des sujets asthmatiques (87 au total) ont été exposés passivement pendant une heure à des aérosols en marge d'une efflorescence de *K. brevis* en Floride (Etats-Unis). Pour ce faire, ces malades volontaires sont allés sur une plage de Sarasota au moment d'une marée rouge (aérosols > 57 ng BTX.m⁻³). Au bout d'une heure, ces personnes présentaient une augmentation statistiquement significative de la fréquence et de l'intensité des symptômes respiratoires autodéclarés (comparaison avant/pendant l'exposition aux embruns). Cette étude, confirme la toxicité des BTX en aérosol, notamment sur des personnes présentant un facteur de risque comme l'asthme.

D'autres populations présenteraient également une sensibilité à l'exposition aux brevétoxines *via* les embruns. En effet, les personnes travaillant à l'extérieur, à proximité des efflorescences, comme les maîtres-nageurs, peuvent représenter une population à risque. Backer *et al.* (2005) ont montré une augmentation des symptômes des voies respiratoires supérieures (irritation des yeux, toux, congestion nasale) et des maux de tête chez les maîtres-nageurs en poste sur les plages de Floride en 2001, alors que la concentration en brevétoxines dans l'air était comprise entre 3,7 et 36,7 ng.m⁻³ et comprise dans l'eau entre 3,3 et 14 µg. L⁻¹ (densité cellulaire comprise entre 96 000 et 764 000 cell.L⁻¹ de *K. brevis* dans l'eau). Les auteurs proposent que les professionnels qui ne peuvent pas quitter leur poste de travail durant la durée d'une efflorescence portent un masque de protection.

De même, les femmes enceintes pourraient constituer une population sensible qui devrait éviter la fréquentation des plages lors d'épisodes d'efflorescences de *K. brevis* au regard des résultats de Benson *et al.* (2006) qui a montré expérimentalement le transfert de brevétoxines vers le placenta de souris en gestation lors de l'exposition par aérosols.

Une façon d'évaluer l'impact global sur la santé publique d'une exposition environnementale consiste à examiner les contacts avec les systèmes de santé locaux. Kirkpatrick *et al.* (2006) ont quantifié le nombre d'admissions aux urgences pendant une période de marée rouge en Floride et les ont comparées aux nombres d'admissions pendant une période sans marée rouge. Les auteurs ont constaté une augmentation du nombre d'admissions aux urgences pour des effets sur la santé respiratoire (notamment, asthme, bronchite et pneumonie) pendant les marées rouges en Floride, en particulier chez les résidents côtiers. Une autre étude a comparé les appels au *Poison Information Center* avec et sans exposition à une marée rouge en Floride. Les résultats suggèrent que les appelants ont présenté des symptômes respiratoires prolongés et une utilisation accrue de médicaments et de visites chez le médecin, parmi ceux qui ont été exposés aux aérosols de la marée rouge (Quirino *et al.* 2004).

Ces données suggèrent que chez les asthmatiques (et peut-être chez d'autres personnes souffrant d'une maladie respiratoire sous-jacente), l'exposition aéroportée aux toxines de la marée rouge de Floride entraîne une maladie aiguë, subaiguë et peut-être chronique (Kirkpatrick *et al.* 2006 ; 2009b 2011 ; Zaias *et al.* 2010). Cependant, l'évaluation initiale des données longitudinales de la cohorte de résidents asthmatiques exposés de façon récurrente aux proliférations de *K. brevis* n'a identifié aucun sous-groupe particulier d'asthmatiques à risque accru, et il ne semble pas y avoir d'effet longitudinal sur la santé au cours des années d'exposition intermittente. Des séries d'expositions intermittentes aux toxines de la marée rouge de Floride en aérosols pendant plusieurs années ne semblent donc pas causer d'exacerbations des problèmes respiratoires chez les asthmatiques. Cependant, d'autres études doivent être menées pour confirmer ces résultats (Bean *et al.* 2011).

Les premiers cas d'irritations respiratoires liés à la présence d'efflorescences de *K. brevis* ont été décrits en 1917 (Patel *et al.* 2020), cependant peu de cas humains ont été décrits (Music *et al.* 1973 ; Asai *et al.* 1982 ; Baden *et al.* 1983 ; Steidinger et Baden 1984 ; Bossart *et al.* 1998 tous cités dans Backer *et al.* 2003). Les données épidémiologiques disponibles sont principalement issues d'études observationnelles menées en Floride. Elles ne permettent qu'une description et une analyse très limitée des troubles respiratoires liés aux brevétoxines, même dans la population des zones les plus touchées.

Les informations sur la prévalence se réduisent à deux enquêtes menées en Floride. Une première menée sur 1100 participants pendant un épisode prolongé de marée rouge (étendu sur 6 mois de décembre 1995 à mai 1996), révèle que la plupart des répondants (416) ont signalé des symptômes. Une fréquence similaire a été observée en 2005 (Backer *et al.* 2005) sur une cohorte de 28 maîtres-nageurs exposés professionnellement aux efflorescences de *Karenia*. Dans une autre étude menée sur 129 individus fréquentant des plages durant deux épisodes distincts de marée rouge en 1999, une réponse inflammatoire (sans qu'il y ait d'effet sur le fonctionnement pulmonaire) a été détectée chez 33% des participants (Backer *et al.* 2003). La distribution des troubles respiratoires dus aux brevétoxines est donc très peu décrite. Plus d'information est disponible sur les déterminants personnels, socio-culturels et environnementaux de ces troubles.

L'asthme, et peut-être d'autres maladies respiratoires sous-jacentes telles que des affections chroniques pulmonaires, ont été identifiés comme facteurs de risque (Fleming *et al.* 2009, Milian *et al.* 2007), cependant aucun lien n'a été trouvé avec les bronchites, pneumonies et autre symptômes neurologiques (Hopkins *et al.* 1997). La répétition des expositions semble être un facteur déterminant dans la maladie. En effet, une différence significative est mesurée dans les effets sur la santé dus à l'exposition aux brevétoxines entre les résidents (depuis au moins 6 mois) asthmatiques vivant à proximité des plages (<1,6 km dans la zone de Sarasota) par rapport à ceux habitant au-delà de cette limite (Fleming *et al.* 2009) lorsque les concentrations de brevétoxines mesurées étaient supérieures à la médiane de 57 ng.m⁻³ (Fleming *et al.* 2009), mais pas lorsqu'elles étaient inférieures. Dans cette même étude, les réponses aux expositions aux brevétoxines par aérosol (au moins 1 h à la plage pendant une journée d'étude avec des cellules > 5000 cell.L⁻¹ et des brevétoxines détectables dans l'air) n'étaient pas significativement différentes selon que le participant était ou non sous traitement pour l'asthme, et aucune corrélation n'a été établie entre la réponse mesurée et l'âge ou le sexe des participants. En revanche, une autre étude a montré une corrélation significative dans la réponse aux expositions (description des symptômes par les participants, et spirométrie avant et après leur passage à la plage) lorsque les participants avaient pris un traitement pour l'asthme dans les 12 h avant d'aller à la plage (Fleming *et al.* 2007). Cette différence était observée uniquement lorsque les concentrations dépassaient les valeurs médianes.

Parmi les déterminants socio-culturels, la **pratique d'activité physique intense** lors d'une efflorescence a été associée à des bronchospasmes persistant 3 à 4 jours (Hoagland *et al.* 2009). Par contre, dans une étude épidémiologique menée chez des travailleurs sains (non asthmatiques), en l'occurrence des sauveteurs en mer, lors d'un épisode de marée rouge en Floride (Backer *et al.* 2005), la pratique d'un exercice léger en extérieur n'a pas eu d'effet sur le fonctionnement pulmonaire (mesuré via FEV1 et débit expiratoire de pointe (PEF)) alors que tous les participants

avaient auto-déclaré des symptômes des voies respiratoires supérieures, y compris toux, irritation de la gorge et congestion nasale.

Si **le lieu de résidence** (à proximité des côtes ou éloigné à plus de 1,6 km), ne semble pas avoir d'influence sur la réponse à une exposition donnée (Fleming *et al.* 2009) sur une cohorte de personnes asthmatiques venant d'être exposées à des embruns contaminés par *K. brevis* et par BTX, la contamination de l'air ambiant est dépendante de la distance par rapport à la masse d'eau contaminée ; les aérosols peuvent être transportés jusqu'à 4,2 km de la plage, et perdent en charge toxinique avec l'éloignement (Kirkpatrick *et al.* 2009).

Parmi les facteurs environnementaux, **le vent, les concentrations en toxines dans la masse d'eau et l'air ainsi que la taille des particules** sont des facteurs déterminants de l'apparition et de la sévérité des signes d'irritations respiratoires associées à l'exposition aux aérosols de brévéttoxines. Les vents du large (*onshore*) transportent les aérosols jusqu'aux plages, et cela d'autant plus que les vents sont forts. Les vents soufflant entre 10 et 20 km.h⁻¹ semblent favoriser l'exposition aux brévéttoxines (Backer *et al.* 2005) et l'apparition des symptômes des voies respiratoires basses (oppression thoracique, respiration sifflante, essoufflement). Lorsque les expositions sont plus modérées, ce sont les irritations des voies respiratoires supérieures (par exemple, irritation des yeux, congestion nasale, irritation de la gorge et toux) qui dominent (toujours dans un groupe de sujets sains). Ces observations vont dans le sens de ce qui avait été observé en 1999 chez une cohorte de 129 individus (dont 38% avec des allergies et 5,4% asthmatiques) fréquentant deux plages de Floride durant deux épisodes distincts d'efflorescences de *K. brevis*. Le vent de terre (*offshore*) soufflant modérément durant le premier épisode a limité les impacts des aérosols sur la plage, et les symptômes des voies respiratoires hautes dominaient. Durant le deuxième épisode, les vents plus forts ont conduit à une exposition accrue aux brévéttoxines aérosolisées et à une prépondérance d'une irritation des voies respiratoires basses.

Une étude menée à Corpus Christi au Texas en octobre 2000 a mis en évidence des irritations respiratoires chez des individus exposés à des concentrations en brévéttoxines dans l'air comprises entre 2 à 7 ng.m⁻³, la taille des particules étant comprises entre 7 et 9 µm. La taille de ces particules leur permet d'être déposées dans l'arbre respiratoire supérieure (région nasale, orale et pharyngée) et être à l'origine des irritations observées (Cheng *et al.* 2005 a et b).

4.5.2.1 Impact économique

Des travaux ont été menés afin de quantifier les impacts économiques des efflorescences de micro-algues nuisibles (HAB-Harmful algal bloom) en général aux États-Unis. Les travaux de Hoagland et Anderson (2002) ont notamment estimé ces conséquences en termes de santé publique, mais aussi sur la pêche commerciale, les loisirs et le tourisme, et sur la surveillance et la gestion (Anderson *et al.* 2000 ; Hoagland *et al.* 2002). Depuis, dans le cadre d'une étude sur le coût de la maladie, un modèle a été proposé pour explorer la relation entre les proliférations de *K. brevis* et les visites pour motif de maladies respiratoires aux urgences dans les hôpitaux de la région (Hoagland *et al.* 2009). Le modèle comprenait des données sur les visites aux urgences pour plaintes respiratoires, les densités cellulaires de *K. brevis* ainsi que les mesures du pollen, des polluants, des maladies communautaires (grippe) et des changements intra-annuels de population. Le nombre de cellules de *K. brevis* décalé d'une semaine depuis la mesure (ainsi que les basses températures de l'air, les épidémies de grippe, les taux élevés de pollen et les visites de touristes) apparaissent dans l'étude comme étant prédicteur du nombre de diagnostics d'atteintes respiratoires spécifiques aux urgences. Les auteurs ont estimé que les coûts pour les maladies respiratoires des salles d'urgence associées aux proliférations de *K. brevis* dans le comté de Sarasota (FL) variaient de 0,5 à 4 millions de dollars, selon la gravité de la prolifération. Il est à noter que cette étude n'a pas pris en compte le coût total des interactions avec d'autres composantes du système de soins médicaux (comme les visites à la pharmacie, les consultations des médecins ou spécialistes).

Nierenberg *et al.* (2010a) ont également évalué les données de présence (temps de travail) des sauveteurs pendant une marée rouge en Floride. L'absentéisme entraîne une augmentation significative des coûts directs et indirects pour les entreprises; l'absentéisme des sauveteurs

pendant une marée rouge en Floride a augmenté considérablement avec des coûts estimés à 3000 \$ / efflorescence. Les coûts capitalisés de l'absentéisme des sauveteurs ont été estimés à 100 000 \$ sur les seules plages du comté de Sarasota (Floride). Les coûts n'ont pas pu être estimés pour le présentéisme, c'est-à-dire le coût des personnes qui viennent travailler lorsqu'elles sont malades. Cependant, les sauveteurs ont déclaré non seulement qu'ils avaient eu des problèmes de santé en raison de l'exposition à une marée rouge en Floride, mais aussi qu'ils pensaient que leur attention et leur capacité à prendre des mesures préventives diminuaient lorsqu'ils travaillaient pendant une efflorescence. Les auteurs ont noté que ce phénomène pourrait affecter la sécurité des plages en entravant la capacité des sauveteurs à identifier et à répondre aux situations d'urgence

4.5.3 Exposition par ingestion d'eau ou contact cutané lors de la baignade

Lorsqu'un individu se baigne ou pratique une activité de sports nautique à proximité d'une efflorescence de *K. brevis*, il peut de façon volontaire ou non, ingérer de l'eau contenant des brevététoxines. L'ingestion d'eau involontaire lors d'une chute dépend du niveau du pratiquant. S'il nage sans combinaison, le contact cutané peut également être une voie d'exposition (Kusek *et al.* 1999; Ramsdell 2008). À ce jour, les effets consécutifs à cette dernière exposition sont peu étudiés.. Les personnes en contact direct avec de l'eau contaminée par des brevététoxines peuvent présenter des irritations oculaires et cutanées (démangeaisons, rougeurs) (Cummins *et al.* 1971 ; Burke *et al.* 2002 ; FAO 2004).

En effet, l'étude de Cummins *et al.* (1971) signale que les auteurs eux-mêmes ont été sujets à des dermatites et des irritations oculaires à la suite des prélèvements qu'ils ont effectués dans l'eau au large. Les densités cellulaire en *K. brevis* étaient de 1 500 à 2 400 cell.mL⁻¹ dans l'eau et de 300 cell.mL⁻¹ dans la zone de déferlement des vagues.

Si les symptômes disparaissent dès que les individus s'éloignent de la masse d'eau contaminée, une exposition prolongée peut provoquer des symptômes qui persistent pendant quelques heures à quelques jours après l'exposition.

La revue bibliographique n'a pas permis d'identifier d'étude décrivant des cas de d'intoxication liés à l'exposition par ingestion d'eau ou par contact cutané suite à la pratique d'une activité de loisirs nautiques. Seules des recommandations mentionnant l'interdiction de nager à proximité d'une efflorescence de *K. brevis* ou de poissons morts ont été recensées. Cependant, dans son rapport de 2004, la FAO indique que des irritations oculaires et respiratoires peuvent apparaître lors de la pratique des activités de baignade à proximité des efflorescences de *K. brevis*. (FAO 2004). Quelques études reportent des irritations cutanées et oculaires apparues chez des personnes ayant réalisés des prélèvements d'eau (Cummins 1971 ; Hemmert 1975).

4.6 Ecotoxicité

En plus des effets sur la santé humaine, les proliférations de *K. brevis* et d'autres espèces du genre *Karenia* ont causé des mortalités massives récurrentes d'invertébrés, de poissons, d'oiseaux marins, de tortues et de mammifères marins et terrestres (Gunter *et al.* 1948; Forrester *et al.* 1977; Landsberg 2002; Landsberg *et al.* 2009).

Les effets des BTX sur des organismes marins ou littoraux ont été montrés par des études après exposition expérimentale ou environnementale. Les BTX induisent des épisodes de fortes mortalités lors d'efflorescences importantes de plusieurs millions de cellules par litre (> 0,5-10 x 10⁶ cellules/L) (Cohen *et al.* 2007).

4.6.1 Transferts des BTX dans les réseaux trophiques marins

Les transferts des BTX dans les réseaux trophiques marins sont illustrés par la Figure 38. Plusieurs voies d'exposition ont été identifiées :

- Exposition directe via l'ingestion de cellules microalgales et/ou la filtration d'eau contenant des BTX. Lors d'efflorescences de *Karenia*, les cellules sont facilement lysées du fait de leur fragilité,

libérant des BTX qui se solubilisent dans la colonne d'eau de mer. Cette voie d'exposition par les cellules et/ou les BTX concerne les invertébrés filtreurs (zooplancton filtreur : tuniciers, copépodes ; coquillages) (Tester *et al.* 2000; Echevarria *et al.* 2012) et les poissons (Flewelling *et al.* 2005; Woofter *et al.* 2005).

- Ingestion via la chaîne alimentaire : les BTX sont accumulées par les herbiers marins et fortement par les épiphytes associés (dont des ascidies, tuniciers filtreurs) dont l'ingestion est une source d'exposition aux BTX démontrée pour les lamantins (Flewelling *et al.* 2005) (O'Shea *et al.* 1991) et supposée pour les tortues (Capper *et al.* 2013). Par des transferts dans la chaîne alimentaire marine, l'exposition par ingestion concerne un grand nombre d'organismes.
- Inhalation : les BTX libérées après la lyse des cellules algales lors d'efflorescences de *Karenia* pouvant être aérosolisées, les animaux peuvent aussi être exposés par inhalation.

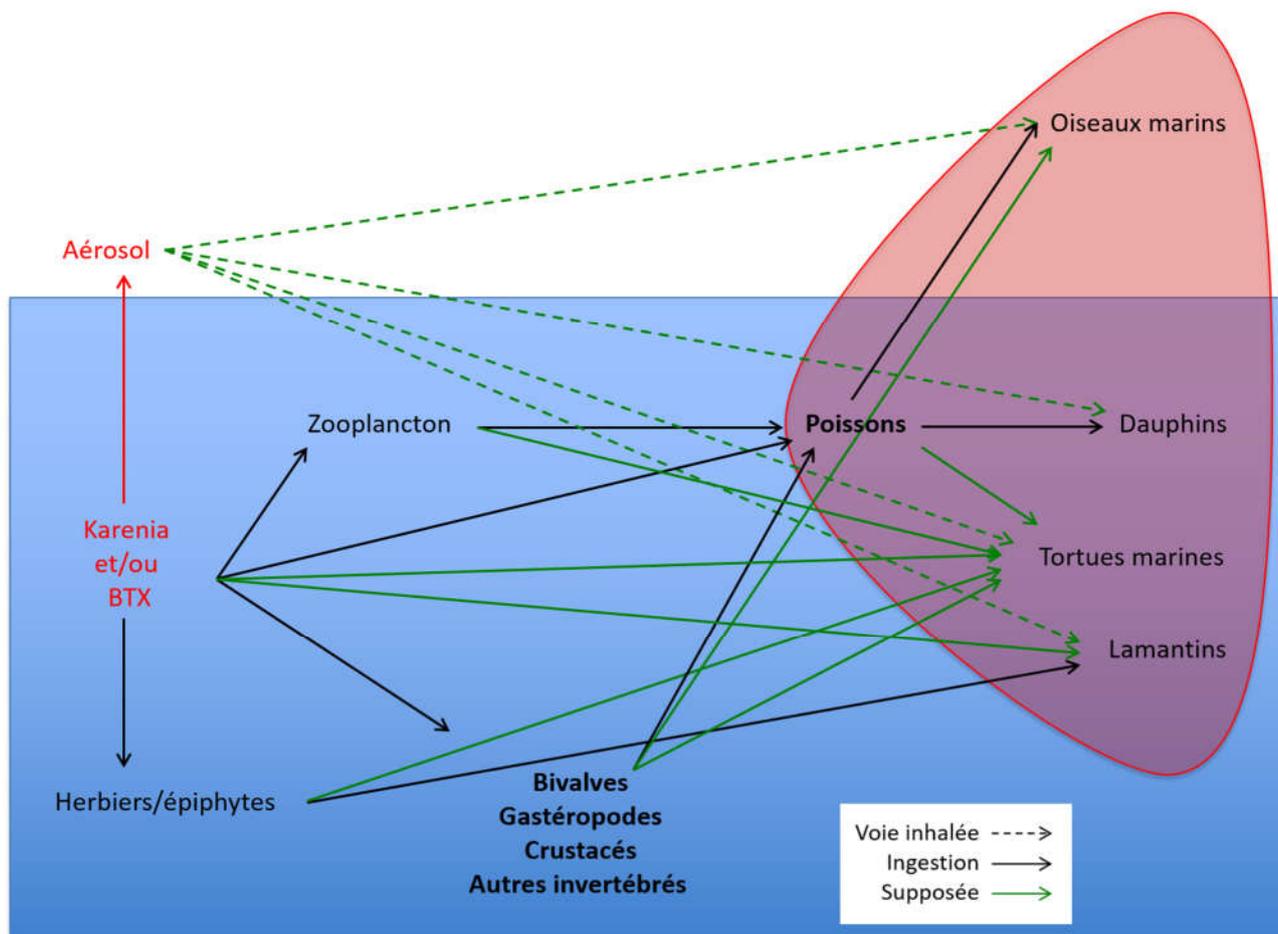


Figure 38 : Transferts des brevetoxines dans les réseaux trophiques marins (en rouge : épisodes de mortalités massives observés)

Des voies d'exposition multiples ont été démontrées ou supposées pour :

- Les poissons : exposition directe (via l'ingestion de cellules de *Karenia* et/ou la filtration d'eau contenant des BTX) et par ingestion de coquillages (Naar *et al.* 2007) et de copépodes (Tester *et al.* 2000; Cohen *et al.* 2007).
- Les lamantins (mammifères herbivores) : exposition par ingestion d'herbiers et d'épiphytes (ascidies) (O'Shea *et al.* 1991; Bossart *et al.* 1998; Flewelling *et al.* 2005) et par inhalation (Bossart *et al.* 1998).
- Les dauphins : par ingestion de poissons (Geraci 1989; Flewelling *et al.* 2005; Fire *et al.* 2008a) et probablement par inhalation (Fire *et al.* 2020b).
- Les oiseaux marins : par inhalation de façon mineure et par ingestion de poissons (Kreuder *et al.* 2002; Van Deventer 2007; Van Deventer *et al.* 2012) et de coquillages (Forrester *et al.* 1977).

4.6.2 Toxicité sur les invertébrés

L'exposition de copépodes à des niveaux environnementaux de *K. brevis* ou de BTX affecte peu leur survie, sauf à forte densité (10^7 cellules/L pendant 24 h) pour certaines espèces (*Temora turbinata*) et après privation de nourriture. Les comportements de nage, à la lumière et alimentaire ainsi que la fécondité des copépodes sont altérés (Prince *et al.* 2006; Breier et Buskey 2007; Cohen *et al.* 2007; Lester *et al.* 2008; Hong *et al.* 2012; Waggett *et al.* 2012; Turner 2014). L'altération des 2 derniers serait liée à une faible qualité nutritionnelle de la microalgue et/ou à son évitement par les copépodes (Prince *et al.* 2006; Speekmann *et al.* 2006; Breier et Buskey 2007).

De fortes densités (10^5 et 10^6 cellules/L) de *K. brevis* ont altéré la viabilité et/ou le comportement de nage de larves de crabes (Gravinese *et al.* 2019). Après exposition pendant 3 j à des cultures de cellules entières et lysées de *K. brevis* (4 et 69 µg/L de BTX totales, respectivement) à des densités de 10, 100 et 1000 cellules/mL, la survie de larves de palourdes, huîtres et pétoncles a été peu affectée. A la plus forte densité, le taux de survie des larves d'huîtres a été plus affecté par l'exposition aux cellules lysées que par celle aux cellules entières. Après 7 j d'exposition, le développement des larves d'huîtres était retardé à partir d'une densité de 1000 cellules/mL. Pour les 3 espèces, la survie des larves était diminuée par une densité de 5000 cellules/mL (Leverone *et al.* 2006). Les comportements de nage et d'alimentation sont affectés à plus faible densité et par des lysats cellulaires (Rolton *et al.* 2014). *K. mikimotoi* à forte densité altère la survie de larves d'ormeau (Shi *et al.* 2012).

L'exposition d'huîtres, moules et palourdes au stade adulte à des BTX et à des efflorescences de *K. brevis*, *Chattonella subsalsa*, *Fibrocapsa japonica* ou *Heterosigma akashiwo* affecte leur croissance et leur reproduction et induit des dommages tissulaires et/ou réponses physiologiques au stress (Li *et al.* 2002; Keppler *et al.* 2005; Keppler *et al.* 2006; McFarland *et al.* 2016; Gonzalez-Romero *et al.* 2017; Rolton *et al.* 2018). L'exposition de moules à des cultures de *K. brevis* favorise la bioaccumulation de cadmium (Pouil *et al.* 2018).

Des réponses et effets néfastes ont aussi été constatés chez des anémones de mer (brunissement et rétractation des tentacules, exudations et sorties des filaments urticants) (Redshaw *et al.* 2011) et des coraux. Des altérations physiologiques ont été constatées chez les adultes et larves du corail *Porites astreoides*. Des courtes expositions à *K. brevis* engendrent du stress oxydatif et une altération de la respiration chez les larves (Ross *et al.* 2010; Reynolds *et al.* 2020).

4.6.3 Toxicité sur les poissons

Des mortalités massives de poissons sont fréquemment associées à des efflorescences importantes de *K. brevis* en Floride et ont été reportées pour *Chattonella cf. verruculosa* au Delaware (côte est des Etats-Unis) et *Heterosigma akashiwo* au Japon (Khan *et al.* 1997; Bourdelais *et al.* 2002). Les doses létales 50 (DL₅₀) de 6-8 nM pour la BTX-3 après 24 h d'exposition sur le poisson d'eau douce *Tanichthys albonubes* et de 35 µg/L pour la BTX-2 après 1 h sur le poisson d'eau douce *Lepomis macrochirus* ont été reportées (Igarashi *et al.* 1998; Schalie *et al.* 2001). L'étude de Naar *et al.* (2007) a démontré expérimentalement le potentiel ichtyotoxique très rapide (7-80 min) des BTX (8-66 ng/mL) une fois libérées dans l'eau par lyse des cellules de *K. brevis* (500-4000 cellules/mL), probablement après absorption rapide par les branchies. La toxicité de *Fibrocapsa japonica* envers des larves de sole a été attribuée aux acides gras plutôt qu'aux BTX (de Boer *et al.* 2012).

Les poissons peuvent cependant survivre après avoir accumulé des BTX. Des poissons marins exposés à *K. brevis* (cellules non lysées) n'ont montré aucun signe de toxicité malgré l'accumulation importante de BTX dans leurs tissus (jusqu'à 2,7 mg eq. BTX-3/kg de viscères et 1,5 mg eq. BTX-3/kg de muscle après exposition expérimentale (Naar *et al.* 2007)). L'élimination des BTX du compartiment sanguin du mulot rayé exposé expérimentalement est lente (50 % éliminés après 5 j (Woofter *et al.* 2005)).

Les signes reportés après exposition aiguë à des doses sublétales de BTX sont un érythème des branchies, un œdème modéré des ganglions du SNC, des dysfonctionnements natatoires et détresses respiratoires et une augmentation de l'activité neuronale dans des régions du cerveau contrôlant les fonctions sensorielles et de coordination (Schalie *et al.* 2001; Lu et Tomchik 2002;

Choich *et al.* 2004; Woofter *et al.* 2005). Il est à noter que les effets d'extraits de *K. brevis* et *Chattonella marina* sur la ventilation sont opposés révélant une nature chimique différente et plus complexe des composés protéiques et lipophiles présents chez *C. marina*, comparés aux BTX de *Karenia* (Shen *et al.* 2010). Chez des poissons grégaires, une exposition même faible (< 55 µg/L) aux BTX entraîne une perte de cohésion sociale et une séparation du groupe qui les rendent plus sensibles aux prédateurs (Wibe *et al.* 2001; Salierno et Kane 2019). Des modifications du niveau d'activité d'enzymes (acétylcholinestérase, monoamine-oxydase) ou d'expression de protéines (hémoglobines, enzymes de détoxification) et de récepteurs de neurotransmetteurs (acétylcholine, glutamate) ont été observées dans le cerveau et le foie (Washburn *et al.* 1996; Nam *et al.* 2010; Tian *et al.* 2011; Yau *et al.* 2019).

Deux études développementales sur le poisson medaka après micro-injection de la BTX-1 et de la BTX-3 au stade œuf (Kimm-Brinson et Ramsdell 2001; Colman et Ramsdell 2003) ont montré un taux de succès d'éclosion diminué, un effet léthal sur les larves et des anomalies développementales (hyperkinésie et une courbure de la colonne vertébrale). Les réponses cardiovasculaires chez les embryons étaient une tachycardie persistante après exposition à la BTX-3 et une bradycardie tardive après exposition à la BTX-1.

4.6.4 Toxicité sur les mammifères, reptiles et oiseaux marins

4.6.4.1 Lamantins

Suite à d'importantes efflorescences de *K. brevis*, des épisodes de mortalité massive de lamantins dont les carcasses contenaient des BTX sont survenus (Fire *et al.* 2015). Les individus vivants présentaient une désorientation (nage en cercles serrés), une incapacité de submersion ou de maintien en position horizontale, une flexion du dos, des mouvements de la bouche, une apathie et une respiration difficile. Les lamantins se sont rétablis en quelques heures à jours. A l'examen macroscopique et histopathologique des cadavres, des lésions non spécifiques (œdème, congestion vasculaire, hémorragies, érythème, hémosidérose) de tissus des voies aériennes et du système nerveux central (SNC), du foie, et des reins, mais aucune lésion gastro-intestinale, ont été observées. Les infiltrats de leucocytes dans les voies respiratoires suggéraient une inflammation chronique et les lymphocytes et macrophages de tous les tissus endommagés étaient marqués par un anticorps dirigé contre les BTX (O'Shea *et al.* 1991; Bossart *et al.* 1998; Bossart *et al.* 2002). Des BTX ont été quantifiées dans divers tissus et fluides de lamantins de Floride (contenus stomacaux, foie, reins, poumons, cerveau, lait maternel et urines) (Capper *et al.* 2013; Fire *et al.* 2015). Les BTX altèrent les fonctions immunitaires des lamantins, ce qui augmenterait leur sensibilité aux infections (Walsh *et al.* 2005; Walsh *et al.* 2007; Walsh *et al.* 2015).

4.6.4.2 Dauphins

Les efflorescences de *K. brevis* ont fréquemment été associées à des épisodes de mortalité massive de dauphins. Des BTX ont été quantifiées dans les tissus, excréments et contenus stomacaux de dauphins, y compris de nouveau-nés et fœtus (transfert maternel *in utero* et via le lait) (Geraci 1989; Flewelling *et al.* 2005; Gaydos 2006; Fire *et al.* 2007; Fire *et al.* 2008b; Fire *et al.* 2011; Twiner *et al.* 2011; Fire *et al.* 2015). Une étude comportementale a mis en évidence une augmentation d'expirations explosives chez les dauphins lors d'une efflorescence, suggérant une irritation respiratoire (Fire *et al.* 2020b). Des dysfonctions immunitaires induites par les BTX sont suspectées de favoriser des maladies infectieuses secondaires (Geraci 1989; Schwacke *et al.* 2010). Il est à noter que d'autres causes ont pu co-contribuer à ces altérations : d'autres toxines produites par d'autres microalgues proliférant dans le golfe du Mexique ont été détectées dans les contenus stomacaux ou tissus de dauphins (Gaydos 2006; Schwacke *et al.* 2010; Fire *et al.* 2011; Fire *et al.* 2020a) et des infections virales (à morbillivirus) ont aussi été montrées impliquées dans des événements de mortalité massive chez les dauphins (Geraci 1989; Twiner *et al.* 2011).

4.6.4.3 Tortues

Des échouages de tortues marines sont survenus à la suite d'efflorescences de *K. brevis* en Floride. Leur sensibilité aux BTX varie selon les espèces, possiblement en relation avec une différence de

régimes alimentaires (les espèces herbivores étant moins affectées) (Flewelling 2008; Fauquier *et al.* 2013b). Les tortues présentaient des oedèmes et des signes neurologiques de sévérité variable (mouvements de la tête, contractions musculaires, ataxie, nage en cercles, absence de réactivité, parésie, léthargie généralisée et coma). Les plus forts niveaux de BTX quantifiés dans les tissus étaient dans les matières fécales, les contenus stomacaux puis le foie, les reins et les poumons (Fauquier *et al.* 2013b; Manire *et al.* 2013; Cocilova *et al.* 2017; Cocilova *et al.* 2019; Foley *et al.* 2019). Un déstockage à partir des graisses est impliqué dans l'exposition pendant la gestation (Perrault *et al.* 2017). Les BTX ont aussi été quantifiées dans des échantillons de tissus de tortues marines échouées en Floride alors qu'aucune efflorescence de *K. brevis* n'y avait eu lieu dans l'année. Les auteurs suggèrent que cette présence pourrait s'expliquer par une exposition à des niveaux non détectés de *K. brevis* (Capper *et al.* 2013; Perrault *et al.* 2014; Perrault *et al.* 2016).

In vitro, la BTX-3 altère la viabilité des neurones corticaux de tortue par un mécanisme dépendant des Na_v (Cocilova et Milton 2016).

4.6.4.4 Oiseaux marins

Des effets néfastes et des mortalités d'oiseaux marins ont été constatés épisodiquement sur les côtes de Floride (Forrester *et al.* 1977; Kreuder *et al.* 2002; Van Deventer 2007), de façon corrélée aux densités de *K. brevis* dans l'eau lors des semaines précédentes. Des BTX ont été quantifiées dans les tissus et fluides biologiques d'oiseaux marins (cormoran, pélicans, hérons et plongeurs) qui présentaient des signes d'ataxie et des convulsions (Naar *et al.* 2002; Fauquier *et al.* 2013a). Faiblesse, désorientation, incapacité à voler ont aussi été reportés, et l'autopsie d'un individu a montré une congestion et une hémorragie du cervelet (O'Shea *et al.* 1991). L'analyse histologique et immunohistochimique de cormorans présentant des signes neurologiques (ataxie cérébelleuse sévère, hypersensibilité aux stimuli, nystagmus) a révélé des anomalies discrètes non spécifiques et une distribution de BTX dans les lymphocytes et macrophages de nombreux organes (Kreuder *et al.* 2002). Des canards plongeurs ont présenté de nombreux symptômes dont certains étaient similaires aux signes induits expérimentalement par l'ingestion de coquillages et/ou d'eau de mer contaminés en BTX (Forrester *et al.* 1977).

4.6.4.5 Animaux terrestres

A la suite d'efflorescences de *K. brevis* le long de l'île Padre (Texas, côte ouest du golfe du Mexique), des effets néfastes ont été constatés sur des animaux terrestres du littoral. Des canidés (coyotes sauvages et chiens domestiques) sont morts et/ou ont présenté des signes neurologiques (tremblements, ataxie, hypersalivation, faiblesse généralisée, convulsions ou paralysie) ainsi qu'anorexie, diarrhées et vomissements, notamment après ingestion de poissons morts. La présence de BTX a été quantifiée dans 73 % des contenus stomacaux et dans des échantillons de tissus. Ces teneurs sont en faveur d'une voie d'exposition par ingestion plutôt qu'inhalée. Une cécité temporaire a été reportée chez un chien qui avait nagé dans une marée rouge. Il est à noter que des teneurs élevées en mercure ont aussi été détectées dans les foies et reins de coyotes. Une augmentation de sensibilité mutuelle aux BTX et autres contaminants de l'environnement a été proposée (Castle *et al.* 2013). Deux jours après une efflorescence de *K. brevis* sur les zones côtières de l'île Padre, suivi de forts vents et houle, des grenouilles ont été retrouvées mortes à 1 km de la mer après avoir présenté des signes neurologiques (tremblements, faiblesse, dyspnée, perte du réflexe de redressement). Leurs tissus contenaient de fortes teneurs en BTX. Des BTX ont aussi été détectées dans de l'eau de pluie et des tissus d'écureuils et coyotes morts ou présentant des atteintes neurologiques, prélevés à 1-9 km de la mer (Buttke *et al.* 2018).

5 Caractérisation du danger

Les données de toxicité chez l'animal sont très limitées et ne permettent pas d'identifier une dose sans effet néfaste ni une dose minimale avec effets néfastes. La seule étude réalisée par voie orale identifiée par le GT avait pour objectif de déterminer les doses létales à 50 % (DL₅₀) de la BTX-2 et de la BTX-3. Cette mesure ne peut pas être retenue comme point de départ d'une valeur toxicologique de référence car cela ne serait pas suffisamment protecteur.

Chez l'Homme, les données sont également trop limitées pour pouvoir établir une valeur toxicologique de référence aiguë (ARfD).

Néanmoins, à partir des données de cas d'intoxications humaines liées à la consommation de coquillages contaminés par des BTX, le GT a identifié des doses (quantité de BTX ingérée) minimales associées à des symptômes (« LOAEL aiguë ») et des concentrations minimales dans les coquillages associées à des symptômes (Tableau 14).

Tableau 14 : Doses minimales de BTX associées à des symptômes (« LOAEL aigus ») et concentrations minimales dans les coquillages associées à des symptômes

Etude	Dose minimale avec des symptômes (« LOAEL aiguë »)	Concentration minimale dans la chair des coquillages associée à des symptômes
McFarren <i>et al.</i> (1965)	405-540 US/personne pour des symptômes moyens. Une dose de 54-81 US/personne a induit des symptômes mineurs (paresthésies seules) chez 1 cas. Des symptômes ont été associés à une dose de 91 US/personne (les auteurs ont pris un poids de chair de 20 g par huître). <i>Complément par le GT :</i> En retenant un poids de chair consommée de 10 g* au lieu de 20 g, le GT estime que la dose minimale avec des symptômes serait de 27-40,5 US/personne (2-3 huîtres à 10 g de chair, contaminées à 135 US/100 g de chair)	135 US/100 g pour des symptômes moyens. > 65 US/100 g
Hemmert (1975)	0,3-0,4 US/kg p.c.	75-118 US/100 g
Morris <i>et al.</i> (1991)		35 et 60 US/100 g
Watkins <i>et al.</i> (2008) Terzagian (2006)		24 et 42,9 mg/kg
Pour comparaison, la teneur maximale retenue par le Codex Alimentarius et l'US-FDA, Nouvelle-Zélande/Australie, Mexique		20 US/100 g 800 µg BTX-2/kg

US : unité souris

* Le GT a considéré une masse de chair de 10 g/huître en prenant en compte un indice de chair de 10 % (celui-ci variant de 6,5-10,5 %) et l'hypothèse d'huîtres de 100 g (calibre n°2, 86-110 g) coquille comprise.

Une unité souris (US) correspond à la quantité d'extrait brut causant la mort de 50% des souris (20 g) en 930 minutes (15,5 h). 1 US = 3,4 µg BTX-3 ou 4 µg BTX-2, selon (Baden et Mende 1982).

Sur la base des données rapportées par Morris *et al.* (1991), Gessner (2000) propose une estimation de la dose entraînant des symptômes mineurs se situant entre 42 et 72 US/personne. Cette valeur est souvent reprise dans les travaux de revue mais elle est jugée très incertaine par le GT. Elle prend pour hypothèse une consommation de 12 huîtres (120 g en considérant un poids de chair de

10 g par huître) comme seuil entraînant des symptômes chez une faible proportion de personnes (13 %, soit 2 cas/15 dans le groupe des faibles consommateurs) parmi 84 consommateurs au total. Cependant, elle se base sur les niveaux de contamination d'huîtres mesurés dans les restes de 2 repas (35 et 60 US/100 g) qui n'ont été à l'origine que de quatre des 48 cas quantifiés. L'article de Morris *et al.* (1991) n'indique pas combien d'huîtres contaminées à 35 et 60 US/100 g ont été consommées par ces quatre cas.

Les études de McFarren *et al.* (1965) et Hemmert (1975) ne figurent pas dans l'avis de l'EFSA (2010).

Le GT a jugé ces deux études particulièrement intéressantes pour la suite de l'expertise car elles comportent des informations détaillées sur la symptomatologie, les portions consommées, le poids des individus (pour l'une d'elle) et la quantification de BTX dans les restes de repas.

Le GT a identifié deux « LOAEL aiguës » pour la suite de ses travaux : celle de 27-40,5 US/personne sur la base de McFarren *et al.* (1965) et celle de 0,3-0,4 US/kg p.c. rapportée par Hemmert (1975).

Le GT a retenu la BTX-3 comme brevétoxines de référence dans les coquillages (et non la BTX-2). La BTX-3 est la BTX de référence pour le test ELISA, elle présente une DL₅₀ plus faible que celle de la BTX-2. De plus, la BTX-2 est minoritaire dans les coquillages, en comparaison de la BTX-3. La limite de 800 µg BTX-2/kg correspond à 680 BTX-3/kg de chair de coquillages.

En équivalent BTX-3 (1 US = 3,4 µg BTX-3), les « LOAEL aiguës » seraient de 92-138 µg eq. BTX-3/personne sur la base de McFarren *et al.* (1965) et 1,02-1,36 µg eq. BTX-3/kg p.c sur la base de Hemmert (1975).

6 Contamination du milieu par les brevétoxines

6.1 Eau

Le contact cutané lors de la baignade ou de la pratique d'activités aquatiques dans une eau contaminée par *K. brevis* peut constituer une voie d'exposition aux brevetoxines. A ce jour, le contact direct avec les toxines dans l'eau a été très peu étudié. La lyse cellulaire de *K. brevis* libère des brevétoxines dans l'eau, provoquant par la suite des irritations cutanées des individus qui sont en contact direct avec l'eau (Kusek *et al.* 1999; Ramsdell 2008).

Les cellules se répartissent le long de la colonne d'eau en fonction des mouvements de « *upwelling* » et « *downwelling* » (Tester *et al.* 1997). D'après Tester *et al.* (1997), le bruit de fond de *K. brevis* dans le *gulf stream* est de l'ordre de 1000 cell.L⁻¹. En cas d'efflorescence, la coloration rouge de l'eau n'est observée que lorsque la concentration en *K. brevis* est supérieure à 10⁶ cell.L⁻¹. Ce constat a été confirmé par plusieurs autres auteurs qui ont observé un nombre de cellules de *K. brevis* lors d'efflorescences entre 200 000 et plus d'un million de cellule par litre (Fleming *et al.* 2005, 2007, 2009 ; Cheng *et al.* 2010).

Pierce *et al.* (2005) ont mis en évidence des concentrations de *K. brevis* dans l'eau de 10⁵ à 10⁶ cellules/L associées à des concentrations en brevétoxines dans la biomasse algale (BTX-1, -2, -3) de < 1 à 14 mg/L. La BTX-2 était la plus abondante (2,4.10⁵ cellules/L, contient 3 mg/L BTX-2 et 1 mg/L BTX-3). Le brévénal (antagoniste de l'action des brevétoxines) a également été détecté dans les échantillons d'eau lors de cette étude.

Pierce *et al.* (2005) ont réalisé un suivi de *K. brevis* et des BTX lors des campagnes de surveillance dans le golfe du Mexique, en présence et en absence de *K. brevis* entre 1998 et 2002. Les BTX observées pendant les proliférations étaient BTX-1, -2, -3. La BTX-2 est abondante dans les cellules de *Karenia* et BTX-3 en dehors des cellules. L'abondance de la BTX-3 augmentait généralement en fin d'efflorescence, indiquant la conversion probable de BTX-2 en BTX-3 lorsque les cellules sont lysées, et la persistance de la BTX-3. Concernant la teneur en BTX intracellulaire, les échantillons d'eau de surface présentaient des concentrations de BTX de 8 à 40 pg/cellule alors qu'elles étaient de 3 à 14 ng/cellule pour les cellules d'eau du fond, suggérant différentes phases de croissance en surface et au fond des eaux.

Roszell *et al.* (1990) a montré que la composition des brevétoxines varie durant les efflorescences. Pendant les phases stationnaires et décroissantes, les concentrations de BTX-1 et BTX-2 diminuent considérablement et celle de BTX-3 augmente.

Un bilan des études menées sur les plages de Sarasota en Floride durant les années 2000 a montré que les concentrations en brevétoxines totales détectées dans l'eau de mer variaient entre 2,25 et 69 µg.L⁻¹. Sur ce site, la BTX-2 était le métabolite majoritairement retrouvé dans l'eau, avec des concentrations moindres en BTX-1 et BTX-3. D'autres analogues de brevétoxines tels que des produits d'oxydation et/ou d'hydrolyse de BTX-1, -2, -3 et -7 ont également pu être identifiés dans l'eau de mer (Cheng *et al.* 2004; Cheng *et al.* 2005a et b; Hardman *et al.* 2004; Lamberto *et al.* 2004; Pierce *et al.* 2003, 2005, 2008, 2011).

D'autres études ont confirmé la présence dans l'eau de BTX-2 et BTX-3 ainsi qu'à des concentrations moindres BTX-1, BTX-B5 et le brévénal (Pierce *et al.* 2003, 2005, 2008 et 2011 ; Bourdelais *et al.* 2005 ; Tester *et al.* 2008). La répartition des analogues est différente en fonction du stade de croissance des efflorescences et de leur intensité, du site de prélèvement et des conditions environnementales (Baden et Tomas 1988 ; Baden *et al.* 2005 ; Pierce *et al.* 2003, 2008, 2011). Les BTX-2 et BTX-3 par exemple semblent être en plus grandes concentrations dans l'écume (respectivement 1900 µg.L⁻¹ et 1200 µg.L⁻¹) que dans l'eau (zone de déferlement-respectivement 20 µg.L⁻¹ et 4 µg.L⁻¹) (Pierce *et al.* 2003). Pierce *et al.* (2008) ont mis en évidence que la concentration en BTX-3 augmente dans l'eau au cours de l'efflorescence et devient majoritaire dans l'eau en fin de cycle d'efflorescence, indiquant la conversion probable de BTX-2 en BTX-3 lorsque les cellules sont lysées. La BTX-3 est stable dans l'eau puisque cette toxine est retrouvée dans l'eau même

lorsque la concentration en *K. brevis* est devenue indétectable (Pierce *et al.* 2008). Tester *et al.* (2008) ont montré la présence de BTX-2 et BTX-3 dans l'eau avec un rapport BTX-2/ BTX -3 plus important à la surface de l'eau qu'en profondeur.

La durée de demi-vie de BTX-2 dans l'eau de mer naturelle exposée à des radiations solaires a été estimée à 3 h dans des conditions de laboratoire. La présence d'oxygène et de matières organiques dans cette eau ralentissent les vitesses de photodégradation de BTX-2 (Kieber *et al.* 2010).

6.2 Aérosols

Lors des épisodes d'efflorescence de *K. brevis*, les brevétoxines peuvent être transférées de l'eau à l'air par l'intermédiaire des aérosols formés dans les vagues ou par les vents. Le lien direct entre la présence de *K. brevis* dans l'eau et les toxines dans l'air a été démontré à plusieurs reprises (Woodcock 1948 ; Roszell *et al.* 1989 ; Backer *et al.* 2003 ; Cheng *et al.* 2005 a et b ; Pierce *et al.*, 2003, 2005, 2008, 2011).

La concentration en brevétoxines dans les aérosols collectés sur la plage dépend de la concentration en brevétoxines présentes dans la zone de déferlement, de la vitesse et de la direction du vent ainsi que de l'exposition de la plage (Pierce *et al.* 2003 ; Backer *et al.* 2003 ; Cheng *et al.* 2005 a et b) En fonction de la position des efflorescences à la surface de l'eau (« surf zone », vagues déferlantes) et du vent (force et vitesse), les concentrations en brevétoxines dans les aérosols évoluent et leur distribution sur la plage et dans les terres également (Tableau 15).

Tableau 15 : Concentrations en brevétoxines¹³ dans l'air en fonction de l'intensité de l'efflorescence dans l'eau (d'après Backer *et al.* 2003)

Analyses	Concentration en brevétoxines dans l'air		
	Faible < 10 ng.m ⁻³	Modérée 10-36 ng.m ⁻³	Elevée 20-93 ng.m ⁻³
<i>K. brevis</i> dans l'eau (cell/L ⁻¹)	11 000-22 000	56 000-112 000	562 000-812 000
Brevétoxines ¹⁴ dans l'eau (µg.L ⁻¹)	1,5-2,6	2,8-3,5	11,7-23,7

Il semble que la zone de déferlement représente la zone où la concentration en brevétoxines dans les aérosols est la plus importante (Pierce *et al.* 2003). La direction du vent peut quant à elle modifier la concentration des aérosols marins présents sur les plages. En effet, les concentrations d'aérosols marins sur la plage sont plus élevées en présence de vent du large qu'en présence de vent terrestre (Cheng *et al.* 2010). Selon ces mêmes auteurs, la concentration d'aérosols marins atteint son maximum lorsque le vent marin présente un angle de 90° par rapport à la côte. Par ailleurs, un vent fort favorise le transport des aérosols à l'intérieur des terres. Les auteurs montrent enfin que les brevétoxines représentent environ 0,01% de ces aérosols.

L'analyse, par LC/MS/MS, des aérosols présents sur la plage de Sarasota en Floride lors des épisodes d'efflorescences de *K. brevis* indique que leur taille est comprise entre 5 et 12 µm et que ces aérosols contiennent des brevétoxines (BTX-1, BTX-2, BTX-3, et BTX-9) (Cheng *et al.* 2005 a et b). Comme dans les échantillons d'eau, BTX-1, - 2, -3 et BTX-B5 sont les analogues majoritaires dans les aérosols. BTX-3 apparaît comme la plus abondante suivie par la BTX-2 et BTX-B5 puis la BTX-1. Des observations similaires ont pu être décrites lors d'une marée rouge à Jacksonville Beach au Texas en 1999, où les principaux congénères présents dans les aérosols étaient la BTX-2 et la

¹³ Analyses de BTX-2 et BTX-3 par HPLC

¹⁴ Analyses de BTX-2 et BTX-3 par HPLC

BTX-3 (Pierce *et al.* 2003). Patel *et al.* (2020) ont confirmé ces hypothèses et ont expliqué que la BTX-3 est le métabolite le plus répandu dans les aérosols marins en raison de la conversion rapide de BTX-2 en BTX-3 une fois libérée de la cellule.

La composition en brevétoxines dans les aérosols varie durant les efflorescences (Roszell *et al.* 1989). Pendant les phases stationnaires et décroissantes de l'efflorescence, les concentrations de BTX-1 et BTX-2 diminuent considérablement et celle de BTX-3 augmente.

Des métabolites issus de l'oxydation ou de l'hydrolyse des toxines sont également détectés dans les aérosols mais pas dans les cellules de *K. brevis* (toxines intracellulaires). La faible concentration de ce type de composés dans les aérosols peut s'expliquer par leur grande solubilité réduisant leur adsorption à la surface des bulles d'aérosols (Pierce *et al.* 1989, 2011).

Une corrélation entre l'abondance en *K. brevis* et la concentration en brevétoxines dans les aérosols n'a pas été démontrée à ce jour (Backer *et al.* 2005). Une étude d'exposition *in situ*, menée sur une période de trois consécutifs, a montré que pour des densité cellulaires de *K. brevis* dans l'eau de $2,4 \times 10^5$ cellules.L⁻¹, les concentrations en brevétoxine dans l'air, mesurées par HPLC-MS, étaient les plus élevées le premier jour, diminuant le deuxième, pour ensuite être à la limite de détection (0,05 ng.m⁻³) le dernier jour, reflétant ainsi un changement de direction du vent de la terre vers la mer pendant la période d'étude (Pierce *et al.* 2005). La quantification des brevétoxines individuelles a montré que la BTX-3 était la toxine la plus abondante dans l'air (5 ng BTX-2.m⁻³ et 20 ng BTX-3.m⁻³). Dans cette étude, la majorité des brevétoxines était associée à une granulométrie d'aérosols comprise entre 2,5 et 9 mm (Cheng *et al.* 2005 a et b). La présence de brevénal a également été détectée dans les aérosols lors de cette étude.

D'autres études *in situ* menées sur cette même plage en Floride ont montré que les brevétoxines peuvent être transportées dans l'air durant un épisode d'efflorescence de *K. brevis* (Kirpatrick *et al.* 2009). Les brevétoxines contenues dans les aérosols présents sur la plage ont été analysés par HPLC-MS. Leur concentration a atteint un maximum de 38 ng de BTX.m⁻³ pour une densité cellulaire en *Karenia brevis* dans l'eau de 2×10^5 cell.L⁻¹. Les mesures menées selon un transect à l'intérieur des terres pendant 5 jours durant la période de l'efflorescence ont conduit à la détection des brevétoxines jusqu'à 4,2 km de la plage avec une concentration maximum 16 ng.m⁻³. La concentration en brevétoxines diminue donc avec la distance et la dispersion des particules qui se déposent au sol. D'autres suivis environnementaux effectués sur cette même plage ont montré que les aérosols peuvent rester dans l'air pendant quatre jours (Zaias *et al.* 2011). Il est donc difficile de prévoir les concentrations de brevétoxines aéroportées sur une plage en fonction des concentrations trouvées dans l'eau au regard de la direction et de la force du vent.

6.3 Eau de pluie et sable

La présence de brevétoxines dans l'eau de pluie a été envisagée par Andronache (2003). L'auteur estimait que compte tenu de la taille des aérosols contenant des brevétoxines (6 à 10 µm), il était possible qu'elles s'accumulent rapidement dans l'eau de pluie et se déposent ensuite lors des précipitations.

Buttke *et al.* (2018) ont mis en évidence la présence de brevétoxines dans l'eau de pluie suite au développement d'une efflorescence de *K. brevis* sur une plage en Floride. La concentration en brevétoxines dans l'eau de pluie collectée à côté de la plage a été évaluée par ELISA à 12,3 ng.mL⁻¹ alors qu'elle était de 0,6 ng.mL⁻¹ dans l'eau de pluie prélevée à 900 m du littoral. Ces prélèvements d'eau de pluie ont été réalisés 9 jours après la découverte de grenouilles mortes à plus de 900 m de la plage, dans lesquelles de fortes concentrations en brevétoxines ont été retrouvées dans le foie et les muscles.

Enfin, le sable peut également être contaminé par les brevétoxines (Castle *et al.* 2013) En effet, l'analyse, par ELISA, des échantillons d'eau et de sable prélevés sur des sites où des poissons sont morts 1 à 2 mois après un pic d'efflorescence de *K. brevis*, a montré que les échantillons d'eau

présentaient une concentration en brevétoxines entre 0,09 et 0,38 ng eq BTX-3 mL⁻¹, et les échantillons de sable une concentration comprise entre 12 et 49 ng eq BTX-3.g⁻¹ pour trois sites mais entre 1,4 et 1,6 µg eq BTX-3.g⁻¹ pour les deux autres sites.

6.4 Coquillages

Les mollusques filtreurs accumulent de fortes concentrations de brevétoxines par ingestion de toxines intracellulaires de *K. brevis* ainsi que les toxines extracellulaires (dissoutes) (Roberts *et al.* 1979; Pierce *et al.* 2006). Il existe peu de données quantitatives sur les cinétiques d'accumulation et de dépuración des brevétoxines chez les bivalves. Les huîtres accumulent les toxines en moins de quatre heures en présence de 5000 cellules/mL et éliminent 60% des toxines accumulées en 36 heures. La cinétique de la dépuración est fonction à l'espèce de coquillages et est très variable, même dans des conditions contrôlées (Viviani 1992). L'huître *Crassostrea virginica* élimine les brevétoxines deux à huit semaines après une efflorescence. La biotransformation des BTX dans les coquillages est spécifique à l'espèce et peut conduire à des dérivés plus toxiques.

Dans l'étude de Bricelj *et al.* (2012), il a été mesuré des concentrations relativement importantes dans les mollusques bivalves (clams, venus) allant de 0,5 mg eq. BTX-3/kg de chair (après 4 h d'exposition à une efflorescence de *K. brevis*) jusqu'à 1,5 mg eq. BTX-3/kg de chair (après 72 h d'exposition). Dans cette même étude, des coquillages naturellement contaminés prélevés dans la baie de Sarasota (Floride) ont atteint pour la palourde américaine (*Mercenaria* spp.) 6,6 mg eq. BTX-3/kg de chair.

Dans une autre étude, McFarland *et al.* (2015) ont mesuré les concentrations en brevétoxines dans la moule verte (*Perna viridis*) et dans l'huître creuse (*Crassostrea virginica*) pendant une efflorescence de *K. brevis* dans le sud-ouest de la Floride. Les concentrations mesurées étaient très importantes et s'échelonnaient de 10,8 à 57,7 mg eq. BTX-3/kg dans les moules et de 0,8 à 33,5 mg eq. BTX-3/kg dans les huîtres. Ces dernières sont restées contaminées de 2 à 8 semaines alors que les moules sont restées au-dessus du seuil réglementaire (0,8 mg eq. BTX-3/kg) pendant près de 5 mois.

Des palourdes (*M. mercenaria*) et des huîtres (*C. virginica*) ont été exposées à *K. brevis* à une concentration de 5.10⁵ cellules/L pendant huit jours, puis transférées dans de l'eau filtrée pour la dépuración (Griffith *et al.* 2013). Les concentrations de BTX ont été mesurées par ELISA. Le pic de concentration a été mesuré après cinq jours d'exposition, avec une concentration moyenne en eq. BTX-3 de 1,0 mg/kg dans les palourdes et 1,99 mg/kg dans les huîtres. Après deux semaines de dépuración, les concentrations tissulaires moyennes chez les deux espèces étaient inférieures au seuil réglementaire, avec 0,204 ± 0,185 mg/kg dans les palourdes et 0,437 ± 0,185 mg/kg dans les huîtres. Les toxines (ou leur métabolisme) sont restées détectables jusqu'à la fin de l'expérience dans les palourdes (0,058 ± 0,239 mg/kg à 139 jours) et les huîtres (0,117 mg/kg à 82 jours).

Des palourdes (*Mercenaria* sp.) exposées à des proliférations récurrentes de *Karenia brevis* dans la baie de Sarasota (Floride) ont été étudiés sur une période de trois ans par Abraham *et al.* (2015), avec un prélèvement bihebdomadaire. Plusieurs efflorescences se sont produites pendant la période d'étude et les échantillons recueillis représentaient ceux avant, pendant et après l'efflorescence. Les analyses ont été réalisées par bio-essai sur souris, ELISA et LC-MS/MS. Les palourdes récoltées pendant une efflorescence élevée (1,5.10⁶ cellules/L) ont présenté une concentration de 80 US/100 g. Des huîtres collectées au même moment au même endroit contenaient 157 US/100 g. Les palourdes étaient contaminées 1 à 2 semaines après le début de l'efflorescence, et restaient à des concentrations > 20 US/100 g pendant plusieurs semaines après la fin de l'efflorescence, en fonction de la densité cellulaire. Par ELISA et LC-MS/MS, des BTX ont été détectées dans tous les échantillons de palourdes prélevés pendant les efflorescences. Huit mois après la fin de l'efflorescence, des concentrations de 1-2 mg eq. BTX-3/kg de tissus ont été mesurés, bien au-delà du seuil réglementaire de 20 US/100 g (800 µg eq. BTX-2/kg).

En général, les mollusques ne semblent pas être affectés par l'accumulation de brevétoxines. La durée de purification des brevétoxines dans les mollusques varie mais se situe généralement entre deux et huit semaines, bien que des rapports fassent état d'une rétention beaucoup plus longue,

près d'un an après l'efflorescence (Summerson et Peterson 1990; Steidinger *et al.* 1998; Plakas *et al.* 2002; Plakas *et al.* 2004; Watkins *et al.* 2008).

Des données de contamination des coquillages sont aussi rapportées dans les publications relatives aux cas d'intoxications humaines (voir section 4.5.1).

Suite à l'intoxication de 2 personnes ayant consommé des gastéropodes (*Triplofusus giganteus*) contaminés par des BTX en mars 2017 en Floride, Abraham *et al.* (2021) se sont rendus une semaine après sur la zone de pêche récréative concernée, affectée par une efflorescence de *Karenia brevis*, pour prélever plusieurs espèces de gastéropodes (*Triplofusus giganteus*, *Sinistrofulgur sinistrum*, *Cinctura hunteria*, *Strombus alatus*, *Fulguopsis spirata*) et une palourde (*Macrocallista nimbosa*). Les analyses de BTX ont été réalisées par ELISA et LC-MS/MS. Tous les gastéropodes (n=10) et la palourde (n=1) étaient contaminés par des BTX. Par ELISA les concentrations variaient de 0,05 à 0,47 mg eq. BTX-3/kg dans le muscle des gastéropodes, et de 0,74 à 198 mg eq. BTX-3/kg dans les viscères. Pour la palourde, la concentration était 42 mg eq. BTX-3/kg de chair totale. Par LC-MS/MS (somme de BTX-2, BTX-3, BTX-B1, BTX-B2, BTX-B5, S-desoxy BTX-B2), les concentrations variaient de 0,09 à 0,57 mg/kg dans le muscle des gastéropodes, et de 0,22 à 58 mg/kg dans les viscères. Pour la palourde, la concentration était 14 mg/kg de chair totale.

6.5 Crustacés

Pérez Linares *et al.* (2009) a montré dans une étude expérimentale que la crevette peut constituer un vecteur non conventionnel de toxines et donc peut représenter un risque potentiel pour la santé humaine. Ainsi, les auteurs ont relevé des concentrations très inférieures au seuil de toxicité (800 µg eq BTX-2/kg) avec des valeurs comprises entre 80 et 90 µg eq BTX-2/kg dans les glandes digestives et le muscle respectivement. Il est à noter que cette contamination apparaît après 45 j d'exposition et pour des concentrations cellulaires en *Karenia* relativement peu élevées (10³ à 10⁶ cell/L).

Dans l'étude de Bricelj *et al.* (2012), la mesure dans les crustacés (*Ampelisca abdita*) et les polychètes (*Mediomastus ambiseta*) donne des valeurs comprises entre 0,04 et 0,2 µg eq. BTX-3/g de chair.

6.6 Poissons

Plusieurs études ont mis en évidence la contamination des poissons par les brevetoxines. Ainsi, dans une étude expérimentale, Naar *et al.* (2007) ont mesuré des concentrations de brevetoxines dans les tambours brésiliens (crokers fish, *Micropogonias undulatus*) et les sars (pinfish) exposés à une culture de *K. brevis*, atteignant 2,675 mg eq. BTX-3/kg dans les viscères et 1,54 mg eq. BTX-3/kg dans le muscle.

Dans une communication (Flewelling *et al.* 2005), ont été rapportés le résultat des investigations conduites en Floride suite à des mortalités de lamenteins (*Trichechus manatus latirostris*) en 2002 et de dauphin en 2007 (*Tursiops truncatus*). Dans les deux épisodes, aucune efflorescence à *K. brevis* n'avait été détectée dans les eaux. Cependant, l'examen des contenus stomacaux a montré la forte contamination d'herbier (*Thalassia testudinum*) dans le cas des lamenteins. Cette contamination a été confirmée dans la fraction épiphytique de ces herbiers prélevés dans le milieu. Dans le cas des dauphins, les aloses (*Brevoortia* spp.), qui composaient majoritairement le contenu stomacal, étaient fortement contaminés par les BTX. D'autres espèces de poissons collectées deux semaines après la mort des dauphins (hareng, maquereaux...) se sont révélés fortement contaminés par les BTX. Ces résultats montrent que même en dehors de période d'efflorescence, la contamination par les BTX de maillons trophiques inférieurs (poissons) peut impacter les maillons trophiques supérieurs (mammifères marins). Les auteurs s'interrogent sur la possibilité d'intoxication de l'Homme par ces poissons contaminés.

Dans l'environnement, ce sont des phytoplanctivores tels que la sardine et autres *Clupeidae* (menhaden; jusqu'à 23 mg eq. BTX-3/kg de viscères et 0,4 mg eq. BTX-3/kg de muscle) ainsi que

des piscivores tels que des mérous ou lutjans (jusqu'à 16 mg eq. BTX-3/kg de viscères et 0,4 mg eq. BTX-3/kg de muscle) qui en contiennent le plus (Naar *et al.* 2007; Twiner *et al.* 2012).

Deux études (Fire *et al.* 2008a; Flewelling *et al.* 2010) ont investigué les concentrations en brevétoxines dans les poissons allant de petits poissons omnivores (sars, tambours, mullets, napoléons (pigfish)) à des prédateurs comme les requins et les raies. Ainsi, Fire *et al.* (2008a) ont pu mesurer des concentrations en brevétoxines dans les proies de dauphins de la baie de Sarasota (Floride) en présence d'une efflorescence de *K. brevis*. En période d'efflorescence, 97 % des poissons prélevés présentaient des concentrations détectables de brevétoxines. Il a été observé que les concentrations variaient fortement en fonction de l'organe analysé. Tous les organes contenaient des brevétoxines mais le muscle était le moins contaminé (de 0,007 mg eq. BTX-3/kg dans le muscle à 6,35 mg eq. BTX-3/kg dans le contenu stomacal). L'étude a aussi montré qu'en l'absence d'efflorescence, les poissons analysés restaient contaminés (de 0,007 mg eq. BTX-3/kg dans le muscle à 0,507 mg eq. BTX-3/kg dans le foie). Dans le maillon supérieur (poissons qui ne sont pas des proies primaires), en l'absence d'efflorescence, 88% des poissons analysés étaient contaminés (analyses uniquement dans les viscères et de 0,03 à > 1,5 mg eq. BTX-3/kg). Lors de cette étude, les auteurs ont pu mettre en évidence la présence de métabolites de la BTX-3 dans les poissons comme la cystéine BTX-B, la cystéine BTX-B sulfoxyde, la cystéine BTX-1 et la cystéine BTX-1 sulfoxyde. Cette étude montre aussi l'impact important des brevétoxines sur les dauphins consommateurs de ces poissons et même en l'absence d'efflorescence.

Dans l'étude de Flewelling *et al.* (2010), les auteurs ont mesuré les concentrations en brevétoxines dans les organes (muscle, foie, branchies, cerveau, contenu gastrointestinal, rein) des requins bordés (*Carcharhinus limbatus*), des requins à nez pointu (*Rhizoprionodon terraenovae*) et des raies (*elasmobranchii*). En dehors des efflorescences, jusqu'à 19 % des échantillons de muscle (Floride ou Keys) sont positifs aux brevétoxines et à une exception près en faibles concentrations (<0,100 mg eq. BTX-3/kg). Les plus fortes concentrations ont été mesurées dans le foie de requin (maximum : 27,760 mg/kg). 97 % des foies des échantillons de Floride et 62 % des foies des échantillons de l'Atlantique étaient positifs aux brevétoxines. Tous les organes peuvent être contaminés et il y a une corrélation entre fréquence des efflorescences et concentrations en eq. BTX-3 dans les organes. L'analyse des spécimens morts pendant les efflorescences a montré des concentrations non négligeables en eq. BTX-3 dans les tissus. Les concentrations variaient de 0,015 à 1,087 mg eq. BTX-3/kg dans les muscles, de 0,239 à 115,734 mg eq. BTX-3/kg dans le foie, et de 0,110 à 11,417 mg eq. BTX-3/kg dans les branchies. Par ailleurs, des brevétoxines ont été mesurées dans des embryons de requins en concentrations non négligeables (573 mg eq. BTX-3/kg dans le foie) montrant ainsi que les brevétoxines passent la barrière placentaire.

Chez le poisson crapaud du Golfe de Mexique (*Opsanus beta*), l'administration par voie orale de la brevétoxine radiomarquée « ¹⁴C-BTX-3 », incorporée dans la farine de poisson, a montré après 72 h que le système hépato-biliaire contenait 40% de la charge toxique, confirmant le rôle clé de ce système dans la détoxification et l'élimination des brevétoxines. Le tissu musculaire en contenait 27%, suivi du tractus gastro-intestinal avec 25% (McFarland *et al.* 2015).

L'impact de poissons contaminés par les BTX sur un événement de mortalité d'oiseaux fréquentant les côtes maritimes de Floride a été investigué par Van Deventer *et al.* (2012) lors d'une efflorescence à *K. brevis*. Ainsi, les auteurs ont pu mesurer des concentrations dans des poissons morts, consommés de façon opportuniste par les oiseaux, allant en moyenne de 0,063 à 0,438 mg eq. BTX-3/kg pour le muscle et de 0,480 à 27,489 mg eq. BTX-3/kg dans les viscères. Ces contaminations varient fortement en fonction de l'organe (muscle, branchie, yeux et viscère) mais aussi en fonction des espèces de poissons (harengs, sardines et mullets). Les concentrations retrouvées dans les oiseaux varient en fonction des espèces et de l'organe analysé (de 0,019 mg eq. BTX-3/kg pour l'estomac à 1,363 mg eq. BTX-3/kg dans les intestins).

L'ensemble de ces études tend à démontrer que le degré de contamination des organismes dépend de la position dans la chaîne trophique. Ainsi les prédateurs supérieurs comme les requins et les raies sont nettement plus contaminés que les poissons de niveaux trophiques inférieurs.

6.7 Sédiments

Deux études (Mendoza *et al.* 2008; Hitchcock *et al.* 2012) ont montré la présence de brevétoxines dans les sédiments en Floride. Les concentrations mesurées étaient très variables et faibles (de non détecté à 0,089 µg eq. BTX-3/g de sédiment sec pour Hitchcock *et al.* (2012) et entre 0,0008 et 0,0036 µg BTX-3/g de poids sec et 0,0027 et 0,0097 µg BTX-3/g de poids sec selon les sites pour Mendoza *et al.* (2008)). La détection des brevétoxines dans les sédiments où *K. brevis* est apparue indique l'incorporation de la brevétoxine dans cette matrice.

7 Surveillance

7.1 Aux USA

Aux Etats-Unis, des systèmes de surveillance réguliers ont été mis en place, principalement en Floride, au Texas, au Delaware et en Alabama. La surveillance et la maîtrise du danger associé aux efflorescences du genre *Karenia* se fait par un suivi régulier de la présence des *K. brevis* dans l'eau, et des BTX dans les coquillages et dans l'air. Elle peut être régulière ou en en réponse à des événements soit de mortalité de poisson, soit de problème respiratoire. Cette surveillance est renforcée par des systèmes d'alerte précoce afin de prédire les risques potentiels d'exposition par consommation ou via l'inhalation de toxines aérosolisées, et de prévenir du danger les consommateurs, les riverains et les producteurs conchylicoles.

Les systèmes d'alerte précoce pour les efflorescences du genre *Karenia* sont opérés par le *National Oceanic and Atmospheric Administration* (NOAA). Ils reposent sur une modélisation du développement et du déplacement des efflorescences (basée sur des modèles de dispersion des particules) à partir de données de surveillance de terrain et satellitaire, en temps quasi réel, et de données atmosphériques et océanographiques (hydrodynamique et caractéristiques physico-chimiques tels que les vents, les courants, la salinité, la stratification, etc.).

7.1.1 Surveillance du phytoplancton dans l'eau

7.1.1.1 Dénombrement au microscope optique

En Floride, la surveillance du phytoplancton se fait le plus souvent à partir d'échantillons côtiers. Cependant, en réponse à des événements toxiques, des échantillons sont aussi prélevés au large (à 80 km ou plus), généralement par des bénévoles ou via les missions de recherche. Le FWC-FWRI¹⁵ gère un réseau de surveillance sur la côte Ouest de la Floride en coopération avec d'autres agences réglementaires de l'Etat et des volontaires (pêcheurs, bateau de charter, etc). Les données sont partagées de façon hebdomadaire en ligne¹⁶. Un numéro gratuit est aussi disponible pour accéder aux données de surveillance.

Au Texas, la surveillance par dénombrement est opérée par le *Texas Parks and Wildlife Department* uniquement en réponse à des événements de coloration de l'eau, de mortalité de poissons ou de problèmes respiratoires. La présence d'efflorescence de *K. brevis* est cependant moins fréquente au Texas qu'en Floride. Il n'existe pas de réglementation spécifique ni de seuil relatif à la présence de *K. brevis* et/ou de brevétoxines dans les eaux récréatives dans cet Etat.

L'Etat du Delaware continue de surveiller la côte de façon régulière (minimum de 2 fois par mois en saison chaude et si possible pendant les mois froids) bien qu'il n'y ait pas eu d'efflorescence depuis 2007 (Bott 2014).

En Alabama, les eaux cotières sont surveillées régulièrement tout au long de l'année ou en réponse à des observations de mortalité de poissons ou de coloration de l'eau (*Alabama Department of Public Health*).

Plusieurs réseaux de sciences participatives contribuent aussi à la surveillance des efflorescences de *Karenia* le long des côtes. C'est le cas par exemple du « *Citizen Monitoring program* »¹⁷ dans le Delaware qui délivre des mesures de phytoplancton aux autorités compétentes et aux scientifiques.

¹⁵ Florida Fish and Wildlife Conservation Commission-Fish and Wildlife Research Institute

¹⁶ <http://research.myFWC.com>

¹⁷ <https://www.citizen-monitoring.udel.edu>

7.1.1.2 Dispositif d'imagerie en flux

Le Texas est doté de deux instruments IFCB (*Imaging FlowCytobot*) qui capturent en temps réel et de façon automatisée des images de phytoplancton sur deux sites côtiers (l'un depuis 14 ans, l'autre depuis 3 ans). Ces instruments d'imagerie en flux associent vidéo à haute résolution et technologie de cytométrie de flux. Les pigments contenus dans le phytoplancton produisent une fluorescence qui déclenche l'enregistrement de la caméra IFCB avec une résolution permettant de visualiser des organismes de 10 à 100 µm. Ce système permet non seulement d'alerter de façon précoce de la présence d'efflorescence mais aussi d'avoir des informations sur la dynamique du phytoplancton.

7.1.1.3 Dispositifs de télédétection

Les données d'imagerie satellite de mesure de la chlorophylle-*a* (Chl-*a*) permettent de détecter la présence de *Karenia*. Cependant, la télédétection n'étant à ce jour pas spécifique d'une espèce (la chlorophylle-*a* est présente dans *Karenia* mais aussi dans les végétaux, les macroalgues, d'autres microalgues et dans les cyanobactéries), cette méthode requiert une vérification sur site. A noter qu'une signature unique de reflet de la Chl-*a* des *Karenia* est en cours de test.

Des algorithmes qui utilisent les modifications hebdomadaires en Chl-*a*, des courants et des vents locaux permettent ensuite de prédire les développements et les déplacements des efflorescences (Stumpf *et al.* 2003). Ces données sont diffusées dans un « bulletin HAB » par le NOAA pour alerter la population via des notifications en ligne avec un délai de 3 heures.

Autre site d'information: *Harmful Algal Bloom Forecasting*¹⁸.

7.1.1.4 Mesure des concentrations de toxines dans l'eau

Le lien entre la concentration en toxines (mesurée par LC-MS, ELISA, RBA) et le nombre de cellules de *K. brevis* n'est pas encore établi. Les facteurs sont nombreux : les toxines libérées sont solubilisées et photo-oxydées, ce qui peut modifier les mesures de concentration. La présence du brevénal peut aussi agir sur les concentrations en toxines. L'état physiologique et la température de l'eau peuvent modifier la production toxinique ou la conversion vers des métabolites à la toxicité plus ou moins marquée. Ces mesures de toxines dans l'eau demandent du temps et du personnel, mais de nouvelles approches méthodologiques, *in situ*, sont en cours de développement. A partir des données de toxicité dans l'eau, des prédictions de mouvement ou des modèles mathématiques 3D peuvent être réalisés.

7.1.2 Surveillance et contrôle sanitaire

7.1.2.1 Fermeture des zones de pêche (surveillance des niveaux de toxines dans les coquillages)

Le « *National Shellfish Sanitation Program (NSSP) Model Ordinance* »¹⁹ prévoit la fermeture des exploitations conchylicoles lorsque des BTX sont retrouvées dans les chairs de coquillage à des niveaux supérieurs à 20 US pour 100 grammes de coquillage, ou quand les comptages des cellules du genre *Karenia* dans la colonne d'eau sont supérieurs ou égaux à 5000 cellules/L (sachant que les niveaux de fonds sont au plus de 1000 cellules/L) (Food and Drug Administration (FDA) 2019).

¹⁸ <https://coastalscience.noaa.gov/research/stressor-impacts-mitigation/hab-forecasts/>

¹⁹ *Guide for the Control of Molluscan Shellfish 2019 Revision* : <https://www.fda.gov/food/federalstate-food-programs/national-shellfish-sanitation-program-nssp>

La réouverture des exploitations peut se faire après analyse des coquillages (par test souris, < 20 US/100 g de chair, eq à 800 µg BTX-2/kg ou par test ELISA). Il est considéré que les coquillages se détoxifient entre 2 et 6 semaines après la fin des efflorescences (retour au niveau du bruit fond de 1000 cell/L). A l'exception de la palourde d'eau salée (*Chione cancellata*) qui peut rester contaminée pendant 1 an (Steidinger *et al.* 1998). Ces valeurs sont appliquées par les Etats membres de l'*Interstate Shellfish Sanitation Conference* (ISSC), l'organe administratif du NSSP. A titre d'exemple, elles sont reprises dans le *Florida's Biotxin Control Plan*, et rappelées sur le site web de la *Florida Department of Agriculture and Consumer Services aquaculture* (FDACS)²⁰. La FDACS collabore avec le *Fish and Wildlife Conservation Commission* (FWC) pour mettre en œuvre le *National Shellfish Sanitation Program Model Ordinance's Marine Biotxin Monitoring* pour les NST.

Cette agence (FDACS) maintient un système d'alerte précoce dans les zones de prélèvement de coquillages. Suivant les concentrations en cellules, la FDACS ajuste son système de prélèvement et augmente la fréquence (Heil 2009). Ainsi, tout résultat supérieur à 5000 cellules/L déclenche la fermeture de l'exploitation des zones conchylicoles (ou pêche de coquillages), associé ou non à un bio-essai positif (>20 US/100 g, eq à 800 µg BTX-2/kg). Pour limiter les impacts économiques, la surveillance est individualisée à chaque zone (face au risque *K. brevis*) voire même en sectorisant certaines zones (mais en fixant une limite > 50 000 cellules/L dans les autres secteurs non réouverts). Une mise en « quarantaine » de certains lots avec bio-essais négatifs (< 20 US/100 g, équivalent à 800 µg BTX-2/kg) est possible. Mais cette possibilité est suspendue si le résultat dans l'eau est > 50 000 cellules/L. Le transfert de coquillages vers des zones peu impactées par *K. brevis* n'a pas été testé (risque de contamination de zones par *K. brevis*).

Un site listant les zones fermées à la pêche est renseigné par la FDACS²¹.

La surveillance est un enjeu majeur à la fois de santé publique et économique. Ainsi, en 2007-2008, un des plus importants épisodes à *Karenia brevis* (majoritairement) a été décrit (Wolny *et al.* 2015). Cette contamination a impacté environ 400 km de côte de Floride pendant 4 mois.

7.1.2.2 Surveillance des toxines dans les poissons

Il n'y a pas de mesure de surveillance des poissons exposés aux brévétoxines. Les niveaux de toxines mesurés dans les filets de poissons ne suggèrent pas de risque sanitaire selon le *Fish and Wildlife Research Institute*. Aucun cas d'intoxication humaine lié à la consommation de poissons contaminés par les BTX n'a été rapporté à ce jour. Le GT note qu'il n'est cependant pas fait mention du potentiel risque lié aux petits poissons consommés entiers (avec les viscères).

7.1.2.3 Surveillance des aérosols et des eaux

A quelques exceptions près, il n'y a en général pas de mesure spécifique de prévention en place pour informer les visiteurs ou résidents de la présence d'une efflorescence et d'un risque potentiel de santé publique. Les médias locaux (TV, journaux, radio) peuvent être une source d'information.

Certains comtés en Floride ont mis en place un système de rapport en temps réel des conditions des plages (*real-time Beach Condition Reporting System* ou BCRS), 2 fois par jour, et comprenant la couleur de l'eau, les risques d'irritation respiratoire et la présence de poissons morts. Des téléphones sont distribués aux maîtres-nageurs et *park rangers* avec une application permettant de rapporter les conditions environnementales. Ils rapportent 2 fois par jour des symptômes de toux, présence de poisson morts, etc. Les données sont aussi partagées rapidement avec la NOAA (Kirkpatrick *et al.* 2008). Le Florida Department of Health²² conseille aux personnes souffrant de

²⁰ <http://www.floridaaquaculture.com>

²¹ http://www.floridaaquaculture.com/SEAS/SEAS_mngmt.htm

problèmes respiratoires graves ou chroniques, tels que l'emphysème ou l'asthme, d'éviter les zones affectées par les marées rouges.

Des volontaires recrutés parmi des maîtres-nageurs utilisent des PDA (*Personal Digital Assistant*). Les personnes utilisent les rapports en quasi temps réel pour adapter leur pratique et fréquentation des plages. Les limitations du système sont : 1) le coût même, s'il est minime par rapport aux gains pour l'utilisation des plages, 2) certains comtés n'ont pas de maîtres-nageurs « professionnels » ce qui limite cette possibilité. Le système a fait ses preuves et il pourrait être associé à des capteurs en temps réel en mer pour rapprocher les rapports des maîtres-nageurs à des données objectives.

L'utilisation d'une « hotline » (941-BEACHES) ou en ligne (<https://visitbeaches.org>) est aussi expérimentée. Les usagers des plages, surtout s'ils sont asthmatiques ou avec d'autres problèmes respiratoires, peuvent alors décider sur quelle plage se rendre. Ces sources sont bien connues des résidents locaux, mais moins accessibles aux touristes (surtout s'ils ne lisent pas l'anglais). Ces mesures restent limitées compte tenu de la dispersion par les vents et les conditions hydrodynamiques des particules aérosolisées. Des conseils sont aussi dispensés, étant donné que les toxines sont associées à des particules, l'exposition peut être partiellement réduite par l'utilisation de masques. De même, les filtres de climatisation ont un effet protecteur.

Une expérience originale de sciences participatives a été initiée en Floride pour la surveillance du risque liés aux brevététoxines. Ainsi en 2017, des volontaires sensibilisés à la culture scientifique ont été formés à l'utilisation du HABscope (Hardison *et al.* 2019). L'utilisation d'un microscope optique relié à une tablette numérique permet l'analyse en temps réel d'échantillons d'eau. Les images sont analysées par un système neuronal (learning machine) qui permet l'identification des *Karenia*. Le seuil de détection est de 100 000 cellules/L, ce qui correspond au seuil pour lequel il existe un risque respiratoire. Le HABscope détecte de façon systématique les niveaux faibles, moyens et élevés de cellules dans l'eau. L'expérience serait concluante même s'il y a une surestimation des faibles concentrations et un risque de classer les concentrations modérées en fortes.

<p>Sneezing? Coughing? Watery Eyes?</p> <p>Your symptoms may be related to Florida Red Tide. People with asthma or respiratory problems should avoid red tide areas especially when winds are blowing on shore.</p> <p>To speak to a health professional anytime, call the Florida Red Tide Health Hotline</p> <p>1-888-232-8635 toll free</p> <p>Breathe Easy During a Red Tide</p> <p><small>S.T.A.R.T. Solutions To Avoid Red Tide, Inc. www.redtideonline.com</small></p>	<p>Eternuments ? Toux ? Yeux larmoyants ?</p> <p>Vos symptômes peuvent être liés à la marée rouge de Floride.</p> <p>Les personnes souffrant d'asthme ou de problèmes respiratoires doivent éviter les zones de marée rouge, surtout lorsque le vent souffle sur le rivage.</p> <p>Pour parler à un professionnel de la santé à tout moment, appelez la ligne d'urgence <i>Florida Red Tide Health</i></p> <p>1-888-232-8635 (appel gratuit)</p> <p>Respirez bien pendant une marée rouge</p>
---	---

Figure 39 : Affiche de prévention (et sa traduction) concernant les symptômes pouvant être associés aux marées rouges en Floride

Au Texas, trois critères définissent une marée rouge (la coloration de l'eau, la présence de poissons morts et l'apparition de difficultés respiratoires chez la population à proximité d'efflorescence). Si la présence d'une efflorescence est mise en évidence selon ces critères, des échantillons d'eau sont prélevés par le département d'État des services de santé, puis analysés et les densités cellulaires classées (Tableau 16). L'État du Texas conseille aux touristes de prendre contact avec le Département d'État des services de santé du Texas lors de leur voyage pour connaître l'état des plages.

Tableau 16 : Effets possibles et seuils de classification appliqués aux USA pour *K. brevis*²³

Niveau	Cellules/Litre de <i>K. brevis</i>	Effets possibles de <i>K. brevis</i>
Presente	<1 000	Aucun
Très faible (a)	1 001 – 4 999	Eventuelle irritation respiratoire chez les personnes sensibles
Très faible (b)	5 000 – 10 000	Eventuelle irritation respiratoire chez les personnes sensibles ; fermetures de la récolte de mollusques et de crustacés
Faible (a)	10 001 – 49 999	Irritation respiratoire plus fréquente dans la population générale ; mais pas répandue
Faible (b)	50 000 – 99 999	Irritation de la respiration plus fréquente ; mort possible de poissons
Moyen	100 000 – 999 999	Irritation respiratoire fréquente dans la population générale ; mort probable des poissons
Haut	>1 000 000	Irritation respiratoire probable dans la population générale ; mort probable des poissons ; décoloration de l'eau

Sur le site du gouvernement fédéral de l'Etat du Delaware ²⁴, il est indiqué qu'en cas d'observation d'efflorescence, il est conseillé de contacter le ministère des Ressources naturelles et du Contrôle de l'environnement en charge des eaux récréatives. Un tableau présentant les possibles effets des *K. brevis* est également proposé.

Lorsque des efflorescences importantes sont observées dans le Maryland²⁵, le public est informé par différents médias notamment par un site internet « Eyes on the Bay ». Il n'existe pas de seuil pour les eaux récréatives.

L'État de Géorgie²⁶ recommande aux personnes dont la peau est sensible aux irritations de ne pas se baigner dans une efflorescence de *Karenia brevis*. Aux baigneurs qui ressentiraient une irritation lors d'une baignade à proximité d'une efflorescence, le gouvernement fédéral conseille de se rincer soigneusement à l'eau douce et déconseille également de nager à proximité de poissons morts. L'Etat de Géorgie recommande le port d'un masque à filtre de particules pour atténuer les effets irritants des aérosols contaminés et l'utilisation d'antihistaminiques en vente libre pour diminuer les symptômes respiratoires.

Il est conseillé également aux personnes ayant des problèmes respiratoires (comme l'asthme ou la bronchite) d'éviter les zones d'efflorescences, en particulier lorsque les vents soufflent en direction du rivage. Si les personnes souhaitent cependant se rendre à la plage, il leur est conseillé d'emporter leur inhalateur et en cas de symptômes, de quitter la plage et de chercher un lieu climatisé.

²³ D'après <https://dnrec.alpha.delaware.gov/watershed-stewardship/assessment/recreational-water-monitoring/red-tide/>

²⁴ <https://dnrec.alpha.delaware.gov/watershed-stewardship/assessment/recreational-water-monitoring/red-tide/>

²⁵ https://dnr.maryland.gov/waters/bay/Documents/HAB_Management.pdf

²⁶ https://www.gachd.org/programs-services/environmental-health-2/harmful_algal_bloom_hab/red-tide-algal-blooms/

Par ailleurs, le CDC (Centers for Disease Control and Prevention) a créé un système de notification volontaire (One Health Harmful Algal Bloom System, OHHABS²⁷) mis à la disposition des services de santé publique des États et des territoires et de leurs partenaires de santé environnementale ou de santé animale permettant de recueillir les informations sur les effets des algues nuisibles sur la santé des Hommes et des animaux. Entre 2016 et 2018, seuls 10% des cas rapportés étaient en lien avec une exposition *via* l'eau de mer.

7.2 Afrique du sud

Les lignes directrices relatives au suivi des eaux marines en Afrique du Sud ne contiennent pas de recommandation de surveillance des *K. brevis* ou des brevétoxines (ministère de l'environnement d'Afrique du sud 2012²⁸).

7.3 Australie et Nouvelle-Zélande

Comme pour plusieurs réglementations concernant les denrées alimentaires, l'Australie et la Nouvelle-Zélande appliquent des normes et recommandations communes. Pour l'Australie, elles peuvent s'appliquer à l'ensemble du pays ou à certaines provinces uniquement.

Ainsi, les règles les plus récentes ont été publiées dans un document guide « *Marine Biotxin Management Plan* » paru en août 2015 (NSW Government 2015) applicable à l'ensemble du pays.

Ce plan de surveillance comporte plusieurs volets notamment la surveillance du phytoplancton toxique mais aussi la teneur en brevétoxines dans les coquillages. Un document guide détaille l'ensemble du dispositif y compris les spécificités techniques de prélèvements et d'analyses (Victorian Fisheries Authority 2016).

Au niveau des seuils et des actions qu'ils déclenchent, le GT retient que pour *K. brevis* et les BTX :

- le seuil de déclenchement de l'analyse de BTX dans les mollusques est de 1000 cellules/L ;
- le seuil de déclenchement d'alerte pour la santé publique est de 5000 cellules/L ;
- le seuil de fermeture des zones de pêche ou d'élevage est fixé pour les BTX à 200 US/kg de chair (extraction à l'éther) pour 6 h d'observation maximum des souris.

Dans l'Etat de Victoria, le département des pêches applique un guide spécifique²⁹ (paru en 2015) qui reprend en grande partie les recommandations du guide national australien. La concentration en eq. BTX2 qui déclenche la fermeture est fixée à 0,8 mg/kg ou 200 US/kg (cette limite est aussi appliquée par la Nouvelle-Zélande). L'approche analytique préconisée est une méthode physico-chimique reposant sur la LC-MS/MS.

Pour le suivi du phytoplancton, le guide préconise une méthode avec un filet à plancton de maille de 20 µm pour intégrer la colonne d'eau. La colonne d'eau intégrée est estimée grâce à la hauteur d'eau et au diamètre du filet. Ce guide classe en 4 catégories les espèces de phytoplancton :

- a1) espèces connues ou suspectées comme productrices de toxines et présentes dans les eaux du sud-est australien (*K. brevis* et *K. mikimotoi* pour les NSP) ;
- a2) espèces présentes dans les eaux et productrices de toxines en Australie ou à l'international (*Karenia cf brevis*, *Gymnodinium aureolum*, *Karlodinium micrum* pour les NSP) ;

²⁷ <https://www.cdc.gov/habs/ohhabs.html>

²⁸ https://www.environment.gov.za/sites/default/files/legislations/summary_sa_water_quality_guidelines.pdf

²⁹ <https://vfa.vic.gov.au/aquaculture/publications/shellfish-quality-asurance/marine-biotxin-management-plan>

- b) espèces potentiellement toxiques (non prouvé) mais présentes dans les eaux australiennes ou ailleurs (*Chattonella marina/antiqua*, *Fibrocapsa japonica*, *Heterosigma akashiwo* pour les NSP) ;
- c) autres espèces potentiellement toxiques hors Australie et potentiellement présentes en Australie (*Gymnodinium aureolum*, *Gymnodinium impudicum*, *Gymnodinium pulchellum*, *Karenia bidigitata*, *Karenia brevisulcata*, *Karenia papilionacea*, *Karenia selliformis*, *Karlodinium micrum* pour les NSP).

La gestion des zones dans l'Etat de Victoria est plus détaillée que le guide national, et comprend 3 niveaux d'intervention en fonction de la concentration en cellules dans l'eau (cellules/L) (Tableau 17).

Tableau 17 : Action de gestion et seuils de déclenchement appliqués dans l'Etat de Victoria en Australie

Espèces	Identification et avertissements professionnels (cellules/L)	Analyse dans les coquillages (cellules/L)	Fermeture préventive en attendant l'analyse des toxines (cellules/L)	Réouverture
<i>K. brevis</i>	1 000	2 000	5 000	2 résultats < 800 µg/kg eq. BTX2 à 48h d'intervalle
Autres espèces*	100 000	250 000	300 000	Pas d'augmentation de l'abondance de phytoplancton

**Karenia mikimotoi*, *K. papilionacea*, *K. bidigitata*, *K. brevisulcata*, *K. selliformis*, Flat, Australian species morphologically similar to *K. brevis* or *K. mikimotoi*, *Karlodinium micrum*, *Gymnodinium impudicum*

Le suivi des eaux récréatives est également réalisé de façon commune en Australie et en Nouvelle-Zélande. Les recommandations sont regroupées dans des lignes directrices dédiées aux eaux récréatives (eau douce et eau salée) « Guidelines for Managing Risks in Recreational Water ».

Le guide identifie les risques potentiels pour la santé à l'égard des différentes concentrations de *K. brevis* (Tableau 18). Les concentrations sont basées sur les concentrations en *K. brevis* retenues pour la fermeture de la récolte des mollusques (5 cell.mL⁻¹) et aussi sur les reports de cas d'irritation respiratoire. En effet, en Nouvelle-Zélande la surveillance de la contamination de l'eau par les brevétoxines sur les sites où sont pratiqués les activités nautiques, comme le surf, est réalisé par le suivi de la concentration en toxines dans les coquillages car ces plages sont difficiles d'accès et les prélèvements d'eau difficiles à réaliser pour les préleveurs (Rhodes 2001).

Tableau 18 : Effets possibles en fonction des seuils de *K. brevis* dans l'eau appliqués en Australie et en Nouvelle Zélande

Niveau	<i>Karenia brevis</i> cell.mL ⁻¹	Effets possibles
Présente	≤ 1	Aucun
Très faible	>1- <5	Éventuelles irritations respiratoires
Faible	5-10	Éventuelles irritations respiratoires. Fermeture des récoltes de mollusques et de crustacés
Moyen	>10-<100	Irritations respiratoires et éventuelles mortalités de poissons
Haut	100-<1000	Irritations respiratoires et mortalités de poissons probables
Très haut	>1000	Même effets que précédemment, avec une décoloration de l'eau supplémentaire.

Source : Guidelines for Managing Risks in Recreational Water (2008)

7.3 Mexique

Sur la côte du golfe du Mexique il y a des registres historiques indiquant la présence d'efflorescences algales nocives depuis le XVII^{ème} siècle. Parmi ces registres, se trouvent ceux de López Cogolludo (1688) au Yucatan, de Lerdo de Tejada (1857) et de Nuñez Ortega (1879) à Veracruz. Une revue détaillée de ces aspects historiques a été faite par Magaña *et al.* (2003).

Le réseau de surveillance des efflorescences algales toxiques du Mexique (RedFAN) a été créé sous l'égide du Conseil National de Science et technologie (CONACYT) en 2014. Les principales tâches du réseau RedFAN sont : (i) de déterminer l'origine des efflorescences algales, (ii) d'évaluer leurs effets sur les écosystèmes, (iii) de caractériser leur impact sur la santé publique, et (iv) de faire des propositions pour la gestion des efflorescences pour le bénéfice de la société et de ses activités productives.

La teneur maximale de BTX fixée par le réseau RedFAN (20 US/100 g de chair de coquillage) est identique à celle fixée par l'US-FDA. Au-dessus de cette limite, il est interdit de commercialiser des coquillages. De nombreux épisodes de mortalités massives de poissons (totalisant plus de 240 tonnes) ont été rapportés de 1996 à 2014 sur les côtes mexicaines. Lors de certaines de ces efflorescences, la concentration en *K. brevis* a atteint jusqu'à 8.10^6 cellules/L, avec une estimation de la concentration en BTX de 325 US (Núñez-Vázquez *et al.* 2016). Parallèlement, ces efflorescences ont impacté la santé humaine (Pérez-Morales et Band-Schmidt 2011). En effet, les embruns marins porteurs de BTX ont provoqué chez les populations exposées en zone côtière des problèmes de santé publique avec des irritations oculaires, de la bouche, de la gorge et du nez, avec rhinorrhées, ainsi que des altérations respiratoires aiguës.

Il n'existe pas de recommandation spécifique pour la surveillance des brevétoxines dans les eaux récréatives au Mexique. En revanche, depuis 2009, trois sites ont été sélectionnés par le ministère de la santé en collaboration avec le NOAA pour surveiller l'apparition des efflorescences de *K. brevis* dans le Golfe du Mexique. Les résultats de ces suivis sont consultables en ligne sur le site du NOAA (Aaké-Castillo *et al.* 2011).

7.4 France

7.4.1 Surveillance des microalgues productrices de brevétoxines et composés assimilés

7.4.1.1 Surveillance des microalgues en France métropolitaine

Le Réseau d'Observation et de Surveillance du Phytoplancton et de l'Hydrologie dans les eaux littorales (REPHY) mis en œuvre par l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (Ifremer) est chargé depuis 1984 d'observer l'ensemble des espèces phytoplanctoniques des eaux côtières et de recenser les événements tels que les eaux colorées, les efflorescences exceptionnelles et les proliférations d'espèces toxiques ou nuisibles pour l'Homme ou pour la faune marine.

La mise en œuvre repose sur neuf LER (Laboratoires Environnement et Ressources de l'Ifremer) implantés sur treize sites répartis sur tout le littoral. La cohérence de l'ensemble est gérée par la coordination nationale basée à Nantes. En particulier, la coordination rédige des documents de prescriptions qui décrivent les modalités de la surveillance.

Le document cadre est le Cahier de procédure REPHY. Ce cahier décrit les objectifs, l'organisation et le fonctionnement, les documents de référence, les stratégies d'échantillonnage, les méthodes d'observation et d'analyse, les procédures qualité, la bancarisation des données ainsi que leur mise à disposition (Belin et Neaud-Masson 2017).

Pour l'observation et le dénombrement, le manuel spécifique au REPHY s'appuie sur la norme NF EN 15204, qui elle-même s'inspire de la méthode Utermöhl de référence (Utermöhl 1958), dont le principe consiste à placer dans une chambre de sédimentation un sous-échantillon d'un prélèvement d'eau fixée au lugol, puis après sédimentation, d'identifier et compter les microalgues à l'aide d'un microscope inversé (Neaud-Masson 2020).

L'inventaire cartographique des lieux de prélèvement disponible sur le site internet de l'Ifremer est mis à jour quotidiennement à partir du référentiel « lieux de prélèvement » de la base de données Quadrige. Il comprend un descriptif détaillé des lieux de prélèvement actifs. Ce site permet le téléchargement des couches cartographiques (<http://www.ifremer.fr/surval2/>).

Il n'y a pas de suivi spécifique des microalgues dans les eaux récréatives marines en France.

En résumé, les prélèvements sont réalisés régulièrement, toute l'année, toutes les deux semaines sur les 38 lieux de surveillance du réseau, sur lesquels l'analyse de la flore totale (toutes les espèces présentes) est réalisée. Ce réseau est complété par 54 lieux échantillonnés mensuellement dans le cadre de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE) sur les quels sont dénombrées uniquement les espèces toxiques ou nuisibles et les espèces dont l'abondance est > 100 000 cellules/L, ainsi que 85 lieux à visée strictement sanitaire sur lesquels seules les espèces toxiques et nuisibles sont recherchées. Ce qui constitue au total un réseau de 177 lieux répartis sur tout le littoral. Selon le contexte, en cas d'alerte liée au phytoplancton toxique par exemple, la fréquence devient hebdomadaire.

Pour la majorité des lieux échantillonnés, aujourd'hui et depuis 2008 (mise en œuvre dans le cadre de la DCE), les prélèvements sont réalisés en sub-surface (profondeur d'1 m sous la surface). Pour certains lieux, pour un suivi des gisements côtiers peu profonds, d'autres prélèvements à visée sanitaire s'y ajoutent au fond (à 1 m au-dessus du fond). Sur les données avant 2008, de nombreux prélèvements étaient effectués à mi-profondeur (c'était la pratique avant la DCE). Sur certains lieux en Bretagne occidentale des prélèvements ont été faits sur la colonne d'eau, par trait de filet à plancton. Ces données qualitatives ne sont actuellement pas bancarisées dans Quadrige, et donc non exploitées dans les paragraphes suivants.

Difficultés d'identification des espèces de *Karenia*

K. papilionacea présente des formes très similaires à *K. brevis*. Morphologiquement, ces deux espèces peuvent être confondues (Figure 40). En microscopie optique, l'angle entre les deux lobes de l'hypotèque est un bon critère permettant de faire la différence entre les deux espèces (*K. brevis* : angle aigu vs *K. papilionacea* : angle obtus) (Figure 40).

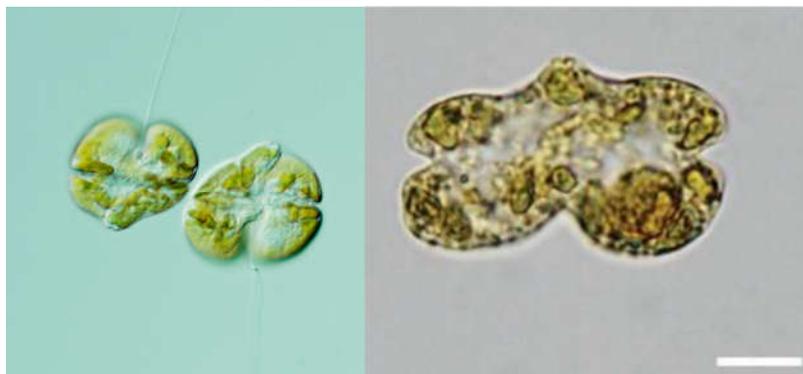


Figure 40 : Comparaison morphologique entre *K. brevis* (à gauche) et *K. papilionacea* (à droite). *K. brevis* en microscopie optique - FWC Fish and Wildlife Research Institute ; *K. papilionacea* fixées au lugol barre d'échelle = 10 μ m, Amzil *et al.* (2021).

Par ailleurs, des confusions sont aussi possibles avec d'autres genres de dinoflagellés gymnodinioïdes tels que : *Karlodinium* (Figure 41), mais aussi certains *Gymnodinium*, *Takayama* ou *Lepidodinium*.

Pour des analystes novices, il est donc difficile de différencier ces genres. Il est, par ailleurs, indispensable d'observer les cellules non-fixées, ce qui permet d'examiner des détails morphologiques rendus invisibles ou modifiés sur des cellules fixées au lugol (Neaud-Masson et Brun 2020).

Compte tenu de la confusion possible en microscopie optique, seule la biologie moléculaire peut permettre une identification sûre.

Plusieurs marqueurs sont actuellement disponibles : la région D1-D2 de la LSU du 28S ADNr, la région hyper-variable V4 de la SSU (petite sous unité) du 18S ADNr ribosomale, ainsi que la région intergénique ITS2 (entre 5.8S et 28S) sont les plus fréquemment utilisées dans les analyses d'identification ou taxinomie moléculaire (Guillou *et al.* 2002; Nézan *et al.* 2014; Engesmo *et al.* 2016). Pour chaque région d'intérêt, la construction standard ou spécifique d'amorces (en 5'-3') permettra de discriminer à différents niveaux les organismes présents dans les échantillons : du groupe, au genre (ex *Karenia*) ou à l'espèce (*K. brevis* vs *K. mikimotoi*) et ainsi de confirmer la présence d'une espèce difficilement observable en microscopie optique. La même démarche est applicable pour détecter et identifier *H. akashiwo* (Bowers *et al.* 2006; Engesmo *et al.* 2016), *Chattonella* spp et *Fibrocapsa japonica*, bien que les séquences déposées dans NCBI soient beaucoup moins nombreuses, rendant plus délicate la construction spécifique d'amorces inter-espèces.

Malgré ces difficultés, les formations dispensées aux analystes du REPHY ainsi que les réseaux d'entraide et d'expertise mis en place permettent d'obtenir des données de plus en plus fiables sur la présence des *Karenia* dans les échantillons d'eau.

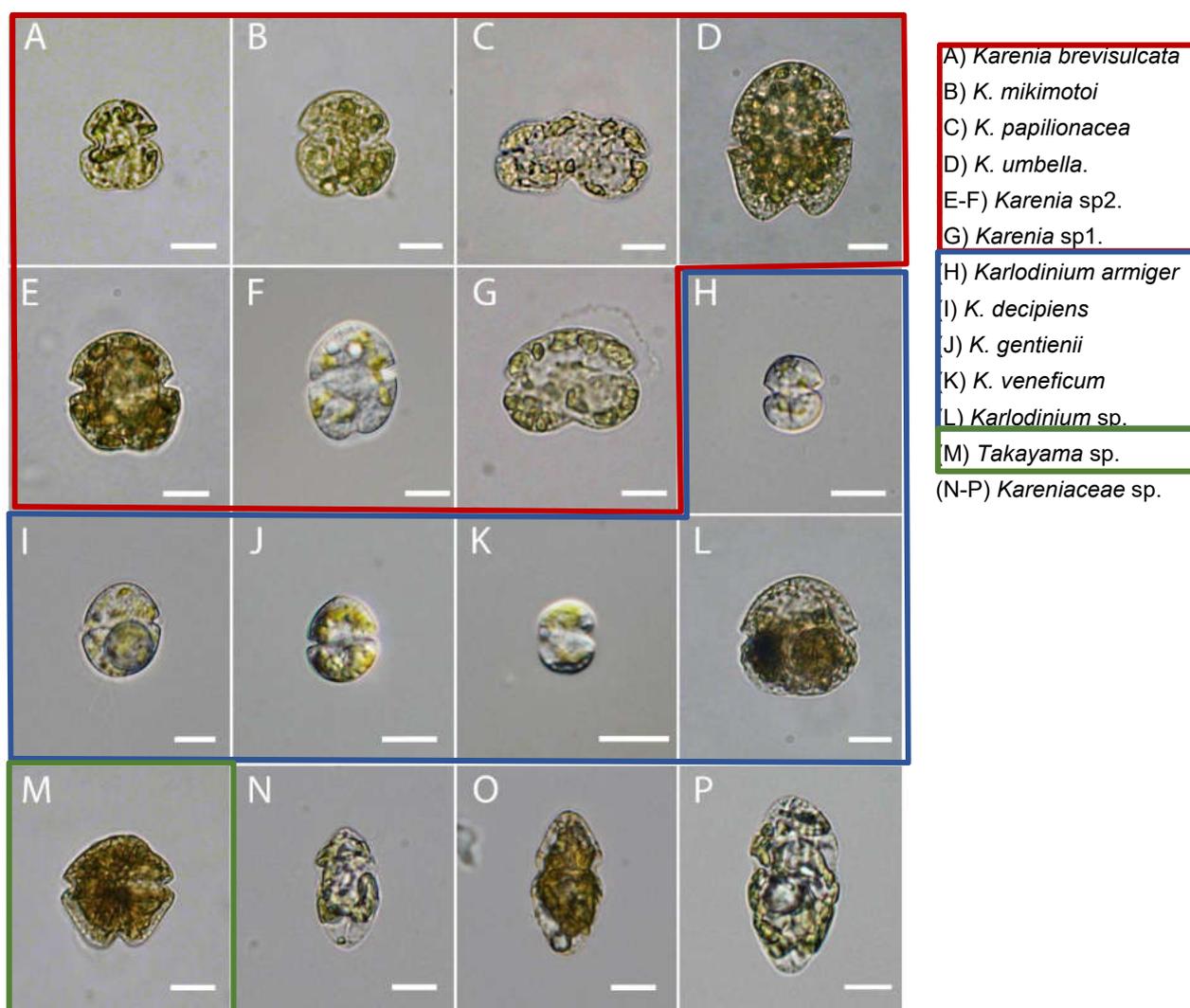


Figure 41 : Photos de cellules de *Kareniaceae*, et en particulier de *Karenia* (cadre rouge), *Karlodinium* (cadre bleu) et *Takaya* (cadre vert) – Cellules fixées au Lugol (A-E, G, L-P), cellules vivantes (F, H-K). Echelle = 10 µm (d'après Nézan *et al.* (2014))

Difficulté d'identification des Chattonellaceae

La fixation au lugol est inadaptée pour l'identification des genres appartenant à la famille des *Chattonellaceae*, mais nécessaire pour leur dénombrement après leur identification sur des cellules non-fixées. Les difficultés sont dues à la sensibilité des cellules à la fixation et à la chaleur de la lumière sous microscope :

- les flagelles sont souvent rapidement détériorés ;
- les détails de surface tels que les rainures deviennent lisses ou obscures.

Des confusions sont donc possibles entre ces différents genres, renforcées par une grande variabilité de la forme des cellules.

Sur un échantillon fixé au lugol, la confusion est particulièrement possible entre *Fibrocapsa japonica* et *Heterosigma akashiwo*. Les espèces du genre *Chattonella* sont généralement plus grandes.

Sur les images de la Figure 42, et en particulier celles des cellules vivantes, la forme de la cellule de *F. japonica* est ovale et comporte des mucocystes (organites en forme de bâtonnet servant à capturer des proies par excrétion de filaments muqueux). Alors que celle d'*H. akashiwo* est allongée, invaginée, et ne possède pas de mucocystes. Les cellules de *Chattonella* sont quant à elles oblongues en forme de goutte. La fixation au lugol déforme aussi plus ou moins les cellules de *Chattonella*.

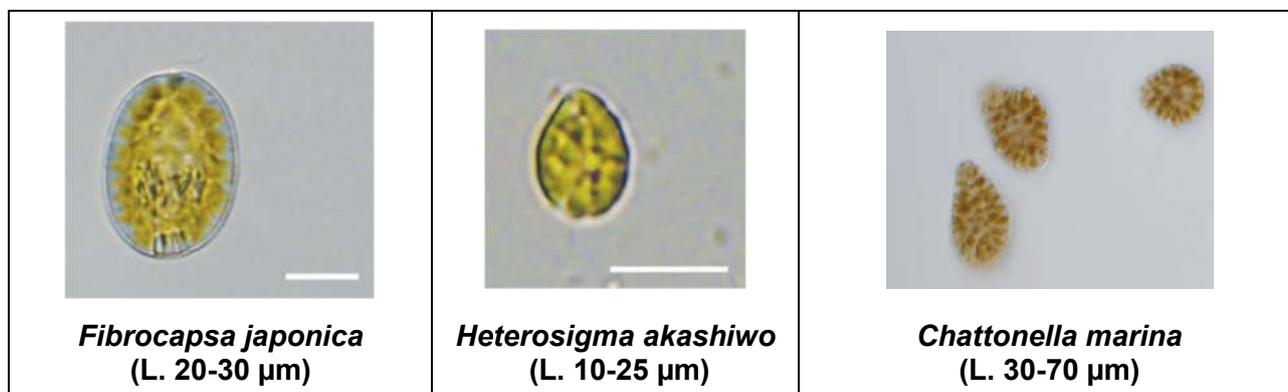


Figure 42 : *F. japonica*, *H. akashiwo*, *C. marina* au microscope optique non fixée (*F. japonica* et *H. akashiwo*, barre d'échelle = 10 µm, Amzil *et al.* (2021) ; [Chattonella marina](#) - FWC Fish and Wildlife Research Institute)

L'apport de la taxinomie moléculaire par amplification PCR et alignement des séquences des fragments de gènes ribosomiaux 18S ADNr, 28S ADNr et régions intergéniques 5.8S ou ITS2 permet d'identifier la présence des 3 espèces, comme le montrent les études de Guillou *et al.* (2002) et de (Bowers *et al.* 2006). Une liste d'amorces fréquemment utilisés est d'ailleurs notée dans l'étude d'Engesmo *et al.* (2016).

7.4.1.2 Occurrences et abondances des espèces potentiellement productrices de brevétoxine dans les données REPHY en France métropolitaine

Selon les experts, il n'y a pas de *K. brevis* dans les eaux françaises. Quatre espèces ont été détectées dans les eaux métropolitaines : *K. mikimotoi*, *K. papilionacea*, *K. longicanalis* et *K. brevisulcata*. Les données sont disponibles dans la base de données SEANOE (REPHY 2019).

L'analyse présentée ci-après présente les traitements suivants :

- sous l'espèce *Fibrocapsa japonica*, ont été regroupées les données du genre *Fibrocapsa*, genre qui ne renferme qu'une seule espèce.
- sous le genre *Heterosigma*, la majorité des microalgues sont identifiées comme *H. akashiwo*. Il existe une autre espèce, *H. minor*, décrite en 2016, mais si elle a été présente dans les échantillons, elle n'a probablement pas été reconnue par les analystes (cellule plus petite et inconnue des observateurs).

- concernant le label « *Karenia brevis* », selon les experts il n'y a pas de *K. brevis* dans les eaux françaises, aussi, les données indiquées comme « *K. brevis* + *papilionaceae* » et « *K. papilionaceae* » sont toutes regroupées sous le label « *K. papilionacea* »
- Le label « *Karenia* (autres) » indique des microalgues dont l'espèce n'a pas été identifiée formellement, mais qui n'est pas *K. brevis*, *K. mikimotoi* ou *K. papilionaceae*. Cependant, certaines peuvent concerner *K. papilionacea*, ainsi les données sont sans doute sous estimées.

Ainsi, les occurrences et abondances notables des 6 regroupements de microalgues susceptibles de produire des brevétoxines ou des composés assimilés en France métropolitaine sont synthétisées dans le Tableau 19 (données REPHY de 1987 à septembre 2020).

Tableau 19 : Détections des taxons potentiellement producteurs de brevétoxines (données REPHY de 1987 à septembre 2020)

	Nombre de détection	Abondance maximale mesurée	Abondance moyenne mesurée	Première année de détection
<i>Karenia mikimotoi</i>	5667	136 320 000	58 685	1987
<i>Karenia papilionacea</i>	471	470 000	1604	1987
<i>Karenia</i> (autres)	241	46 900	620	2008
<i>Heterosigma akashiwo</i>	893	132 960 000	189 297	1994
<i>Fibrocapsa japonica</i>	102	190 000	6291	1992
<i>Chattonella</i>	29	33 700	1658	1993
Sur l'ensemble des microalgues	7403	136 320 000	67 973	1987

Sur la Figure 43, sont illustrés les différents lieux où ont été détectés les 6 regroupements de microalgues depuis 1987. L'analyse de ces cartes montre que les microalgues ont été présentes sur toutes les façades maritimes métropolitaines.

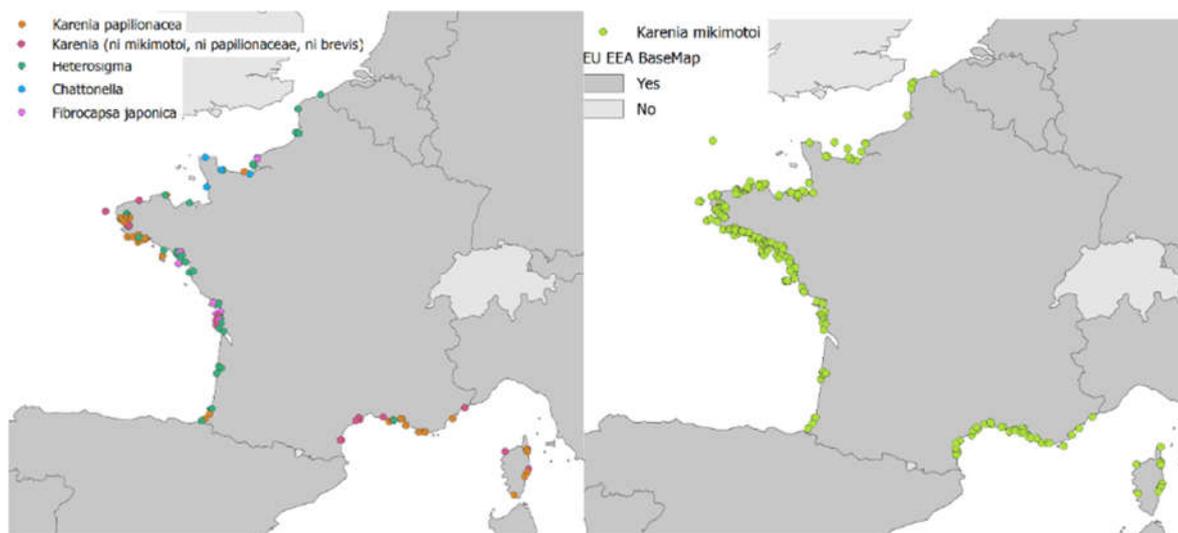


Figure 43 : Occurrence des *Karenia papilionacea*, autres *Karenia*, *Heterosigma*, *Chattonella* et *Fibrocapsa japonica* (carte de gauche), et des *Karenia mikimotoi* (carte de droite), recensées sur la période 1987 à août 2020 par le REPHY. [Carte produite le 09 novembre 2020 via l'ECDC Geoportail, limites administratives : © EuroGeographics, © UN-FAO]

La Figure 44 illustre les occurrences des différents groupes de microalgues sur la période 2000-août 2020. Depuis le début de la surveillance en 1987, les deux taxons les plus fréquents et qui ont présenté les plus fortes abondances sont *Karenia mikimotoi* et *Heterosigma akashiwo*.

Fibrocapsa japonica et *Chattonella* sont beaucoup plus rares, mais comme indiqué au point 7.4.1.1, ces taxons sont particulièrement difficiles à détecter et identifier avec les méthodes d'identification sur critères morphologiques au microscope. Il est donc possible que ces données soient sous estimées.

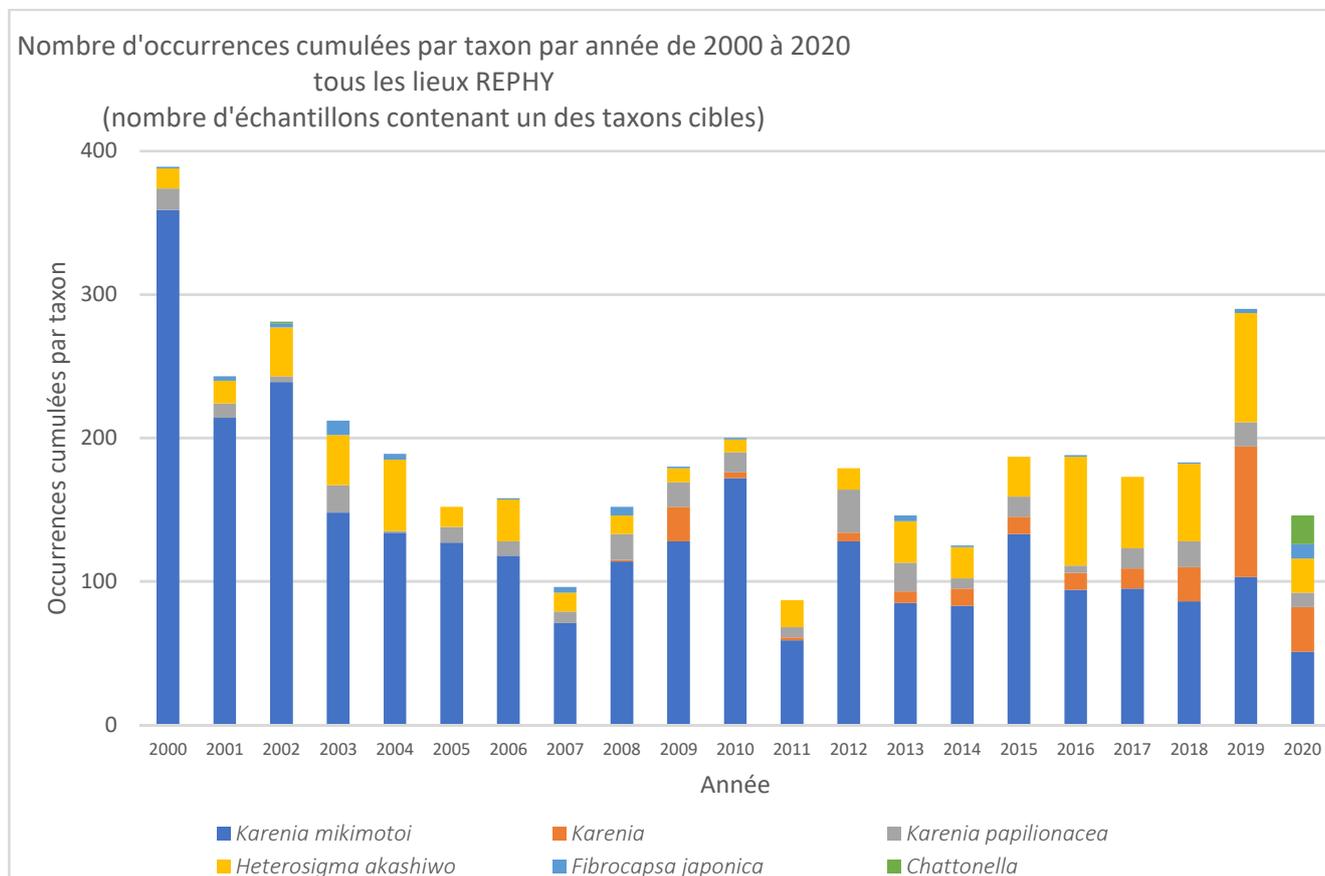


Figure 44 : Evolution des occurrences de *K. mikimotoi*, *Karenia* sp., *K. papilionacea*, *H. akashiwo*, *F. japonica* et *Chattonella* spp. par année de 2000 à 2020

7.4.1.3 Résumé des occurrences et abondances des différentes espèces

- *Karenia mikimotoi* est une espèce répandue sur tout le littoral français métropolitain, de manière sporadique en Manche et plus régulièrement sur le reste du littoral. *K. mikimotoi* est fréquemment observée dans les échantillons, son identification ne pose pas de problème aux analystes. Généralement présente à des concentrations de quelques centaines à quelques milliers de cellules par litre, cette espèce a présenté des abondances exceptionnelles à plusieurs reprises. En particulier en rade de Brest en 2002 avec plus de 136 millions de cellules/L, et en baie du Mont Saint-Michel en 2007 avec plus de quatre millions de cellules/L.
- *Karenia papilionacea* est quasi absente en Manche mais régulièrement observée d'une à six fois par an dans le Finistère, le sud Bretagne et en Méditerranée. Les concentrations ne dépassent pas quelques centaines de cellules/L en Atlantique. En revanche, c'est en Corse que l'on observe des abondances remarquables avec 470 millions de cellules/L en 2006 dans l'étang de Biguglia, et de 2006 à 2010 des abondances de plusieurs milliers de cellules/L dans l'étang d'Urbino (maximum 54 400 cellules/L en 2007).

- *Heterosigma akashiwo* est commune et régulièrement observée en Manche et en Atlantique, plus rare en Méditerranée. Généralement présente à des concentrations de quelques centaines à quelques milliers de cellules/L, cette espèce a été particulièrement abondante en 1994 dans le Finistère (maximum > 132 millions de cellules/L) et en 2013 dans le Morbihan (maximum de 3 millions de cellules/L).
- *Chattonella* spp. sont rarement présentes. Leur présence a été toutefois suspectée à une concentration remarquable de 33 700 cellules/L en 2020 dans le Finistère.
- *Fibrocapsa japonica* est quasi absente en Manche et en Méditerranée, et très sporadiquement observé en Atlantique. Les concentrations sont généralement faibles, mais en 2013 elles ont atteint un maximum de 190 000 cellules/L dans le Morbihan.

La carte en Figure 45 illustre la répartition géographique des abondances des microalgues productrices de brevétoxines et molécules assimilées détectées sur la période 1987 - août 2020 (c'est-à-dire, *Karenia papilionacea*, *Karenia* (ni *mikimotoi*, ni *papilionacea*, ni *brevis*), *Heterosigma*, *Fibrocapsa japonica*, et *Chattonella*).

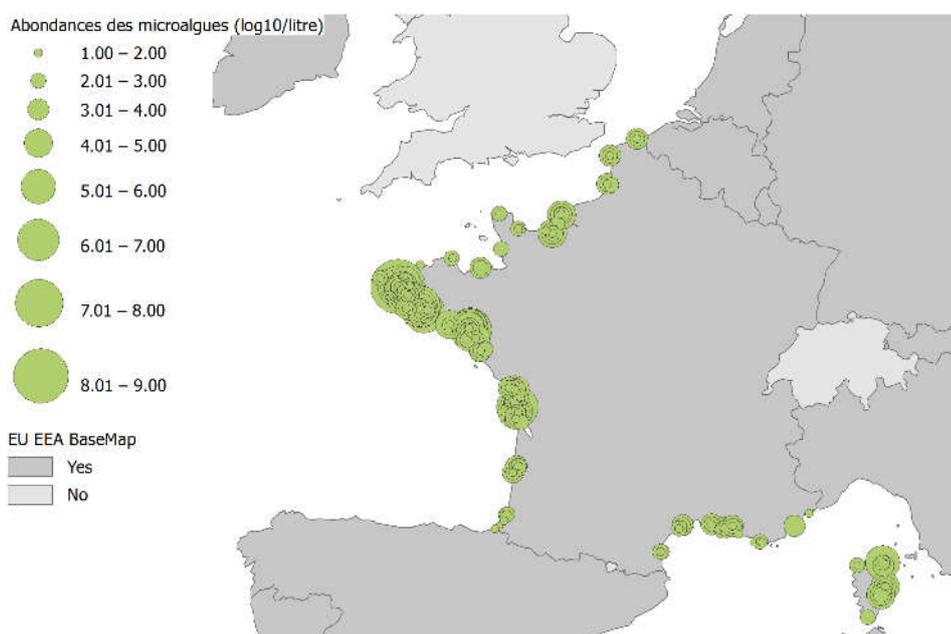


Figure 45 : Abondances des *Karenia papilionacea*, autres *Karenia* (ni *mikimotoi*, ni *papilionacea*, ni *brevis*), *Heterosigma*, *Chattonella* et *Fibrocapsa japonica*, recensées sur la période 1987 à septembre 2020 par le REPHY. [Carte produite le 09 novembre 2020 via l'ECDC Geoportal, limites administratives : © EuroGeographics, © UN-FAO]

Karenia papilionacea, bien que peu fréquente dans les observations (471 occurrences de 1987 à 2020), a montré des abondances supérieures à 20 000 cellules/L dans 5 échantillons en Corse (Lagunes de Biguglia nord et de Palu) avec un maximum très élevé de 470 000 cellules/L en août 2006. Ces données ne peuvent pas être rattachées à des données sur les toxines identifiées dans les coquillages dans le cadre d'EMERGTOX, puisqu'il n'y a pas d'exploitation coquillière de ces deux étangs. En Corse, seul l'étang de Diana fait l'objet d'une surveillance triple du REPHY, REPHYTOX et EMERGTOX.

7.4.2 EMERGTOX – réseau de veille d'urgence des biotoxines marines dans les coquillages

7.4.2.1 Objectifs du dispositif EMERGTOX

Le réseau EMERGTOX est mis en œuvre, depuis janvier 2018, en complément du réseau national de surveillance des toxines réglementées (REPHYTOX) et des plans de surveillance de la DGAL. EMERGTOX a pour objectifs :

- la mise en évidence éventuelle d'un danger lié à la présence dans les coquillages de toxines connues réglementées et non réglementées, répertoriées en France ou pouvant être introduites en France *via* les eaux de ballast ou les échanges commerciaux entre pays ;
- l'acquisition de données sur les principaux groupes de toxines lipophiles et hydrophiles répertoriés au niveau international, pour contribuer à l'évaluation des risques liés à la présence de toxines nouvelles ou émergentes dans les coquillages ;
- l'identification, en cas de détection de toxines non encore répertoriées en France, des microalgues toxiques émergentes, *via* une expertise rétrospective des prélèvements d'eau associés aux points EMERGTOX, réalisés dans le cadre du REPHY.

Le réseau de veille d'urgence EMERGTOX couvre à la fois des besoins de recherche et de protection du consommateur. Son déroulement complet est détaillé dans un cahier de prescription EMERGTOX.

Les toxines suivies dans EMERGTOX sont les phycotoxines lipophiles dont les brevétoxines, les cyanotoxines lipophiles, les phycotoxines hydrophiles (groupes des saxitoxines, de l'acide domoïque, des tétrodotoxines, de la β - Méthyl-Amino-Alanine (BMAA)) et les cyanotoxines hydrophiles.

7.4.2.2 Organisation générale d'EMERGTOX

Le pilotage de ce réseau est assuré par un comité national, sous l'égide de la DGAL, composé de membres représentant différents organismes et institutions nationaux (Anses³⁰, DGAL³¹, DGS³², SpF³³, DPMA³⁴, Ifremer³⁵, DEB³⁶). Le fonctionnement du comité de pilotage est détaillé dans un protocole spécifique. Les résultats obtenus dans le cadre du dispositif EMERGTOX sont transmis régulièrement à ce comité de pilotage, notamment pour la prise de décision et les suites à donner en matière de gestion d'un risque éventuel pour le consommateur ou de mise en place d'études et de recherches complémentaires. Il est rappelé que tout résultat permettant de suspecter un risque sanitaire doit être transmis à la DGAL dans les plus brefs délais.

Le réseau EMERGTOX concerne onze zones de production de mollusques bivalves réparties sur tout le littoral français métropolitain. La Figure 46 donne la carte générale des lieux suivis dans le cadre du dispositif EMERGTOX. La mise en œuvre opérationnelle repose sur les laboratoires d'Ifremer (Laboratoires Environnement Ressources "LER", laboratoire Phycotoxines "PHYC") et le LNR Biotoxines marines de l'Anses. Sur chacun des points, un prélèvement mensuel de mollusques est réalisé toute l'année, et fait l'objet d'analyses chimiques.

³⁰ Anses : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

³¹ DGAL : Direction Générale de l'Alimentation

³² DGS : Direction Générale de la Santé

³³ SpF : Santé Publique France

³⁴ DPMA : Direction des Pêches Maritimes et de l'Aquaculture

³⁵ Ifremer : Institut Français de recherche et d'exploitation de la mer

³⁶ DEB : Direction de l'eau et de la biodiversité

La cohérence de l'ensemble est gérée par une coordination nationale, assurée par l'Ifremer et chargée, en partenariat avec le LNR (Anses), de la programmation, du suivi opérationnel, de la valorisation et de la diffusion des résultats. Des correspondants EMERGTOX, identifiés dans chaque LER et au sein du LNR (Anses), sont les contacts privilégiés de la coordination nationale.



Points de prélèvements de coquillages	Coquillages prélevés
"Pointe de St Quentin"	Moules
"Moulières d'Agon"	Moules
"Arguenon pt 5"	Moules
"Le Scoré"	Moules
"Kervoyal"	Moules
Baie d'Yves (a)	Moules
"Mus de Loup (a)"	Huîtres
"Banc Arguin"	Huîtres
"Marseillan (a)"	Huîtres
"Etang de Vic - Passe"	Palourdes
"Diana centre"	Moules

Figure 46 : Carte générale des lieux suivis dans le cadre du réseau EMERGTOX (à la date de novembre 2020)

7.4.2.3. Bilan EMERGTOX relatif à la détection des brevétoxines

La Figure 47 regroupe les résultats relatifs à la détection des brevétoxines dans les glandes digestives (GD) de moules de Diana en Corse suivies depuis janvier 2018. Les brevétoxines (BTX-2 et/ou BTX-3) ont été détectées pour la 1^{ère} fois en France en automne 2018 et en hiver 2019, avec un maximum de 57 µg BTX-2,3 par kg de chair totale de moules. Des traces de ces toxines (< LQ de 70 µg/kg GD) ont également été détectées en automne 2019³⁷.

Des analyses complémentaires ont été réalisées dans le reste de la chair (parties autres que la glande digestive) des moules contaminées de novembre et décembre 2018. En plus des moules, des huîtres ont fait l'objet d'une analyse à la fois dans les GD et le reste de la chair. Ces analyses n'ont pas montré la présence de BTX ni dans les restes de la chair des moules et des huîtres ni dans les GD des huîtres.

³⁷ Ces résultats ont été publiés par l'Ifremer dans un article mis en ligne en juillet 2021, non disponible au moment de l'expertise (Amzil *et al.*, 2021).

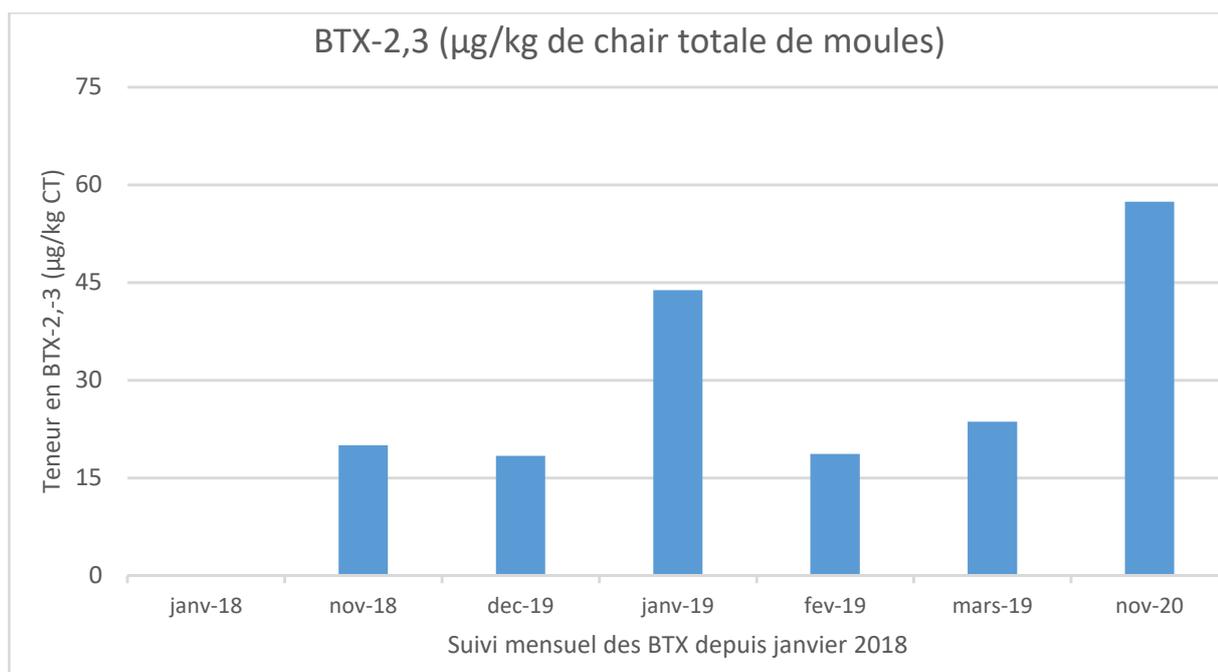


Figure 47 : Suivi mensuel des BTX (BTX-2 et BTX-3 cumulées) dans les moules de Diana en Corse entre janvier 2018 et novembre 2020

Par ailleurs, une recherche rétrospective de ces toxines a été menée sur les échantillons du dispositif "Vigilance " de 2015, 2016 et 2017³⁸. Aucune brévétotoxine (BTX-2 ou BTX-3) n'a été détectée dans les échantillons de 2016 et 2017. La BTX-3 a été mesurée à une concentration de 135 ng/g de GD dans l'échantillon de novembre 2015.

La détection des BTX pourrait s'expliquer par la présence, en 2018 et 2019, de *Karenia sp.* et/ou d'autres organismes producteurs potentiels de ces toxines (voir § 7.4.2.3.), dans les prélèvements d'eau effectués en parallèle des prélèvements de coquillages. Des investigations complémentaires sont donc nécessaires pour apporter des éléments de réponses sur l'origine de ces toxines. Il est donc primordial d'identifier l'espèce ou les espèces de microalgues productrices de ces toxines dans la lagune de Diana Centre en Corse.

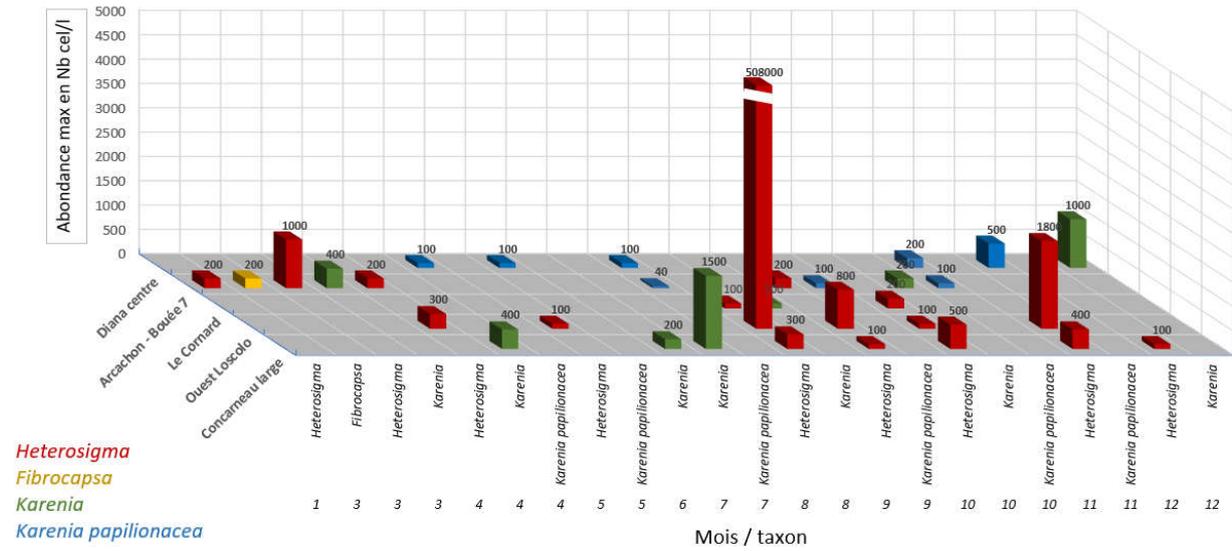
7.4.2.3 *Karenia spp.* depuis 2018 sur les lieux REPHY associés à EMERGTOX

Sur les figures suivantes, sont représentées les abondances maximales mensuelles des *Heterosigma*, *Fibrocapsa*, *Chattonella*, *Karenia sp* et *Karenia papilionacea* de 2018 à novembre 2020, sur les lieux associés aux lieux EMERGTOX pour lesquels au moins une espèce de *Karenia* a été observée.

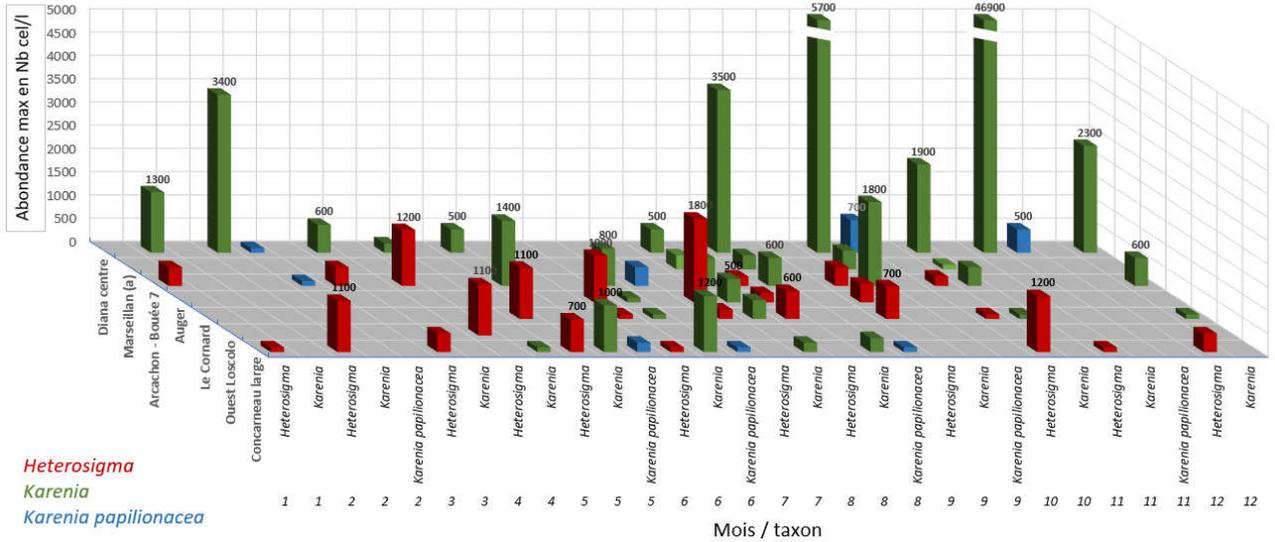
Les données sélectionnées comprennent : *Karenia* + *Karenia papilionacea* + *Karenia mikimotoi*.

³⁸ Les échantillons des mois suivant ont été testés : 2015 : janvier, février, mars, avril, juin, juillet, août, septembre, novembre et décembre ; 2016 : août, septembre, octobre, novembre, décembre ; 2017 : janvier, février, mars, avril, juin, juillet, novembre, décembre.

Abondances maximales des microalgues par mois et par lieu en 2018



Abondances maximales des microalgues par mois et par lieu en 2019



Abondances maximales des microalgues par mois et par lieu en 2020

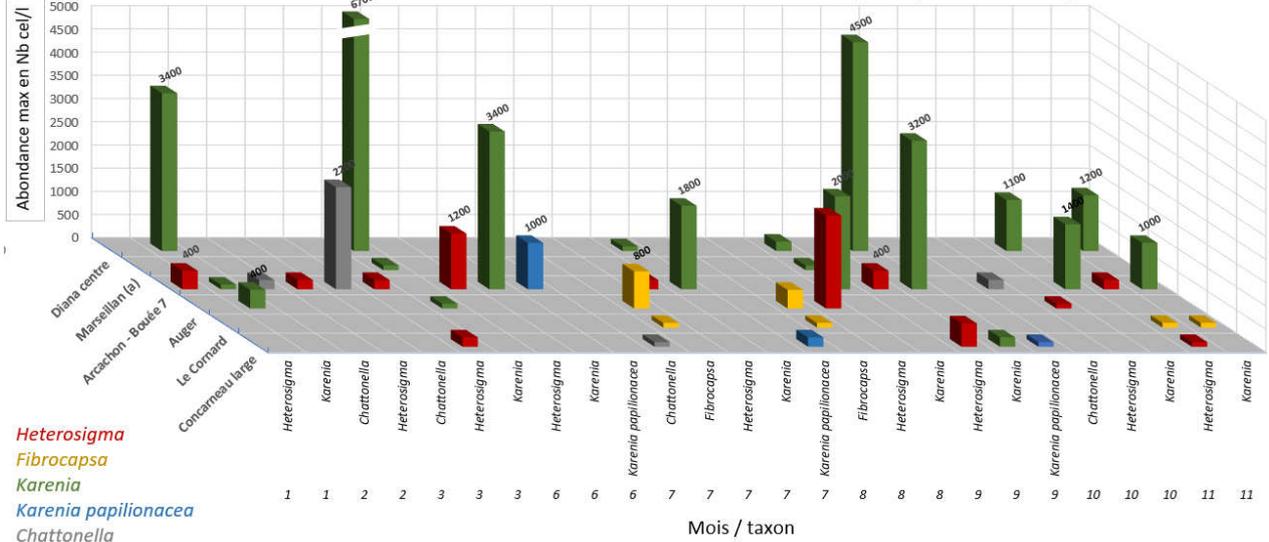


Figure 48 : Evolution des abondances maximales mensuelles des *Heterosigma*, *Fibrocapsa*, *Chattonella*, *Karenia* sp et *Karenia papilionacea* de janvier 2018 à novembre 2020

On constate qu'aucune présence des espèces cibles n'est enregistrée sur les lieux de la Manche depuis 2018. Le lieu où ces genres, et en particulier les *Karenia*, sont les plus fréquents et abondants est dans l'étang de Diana en Corse.

Concernant l'espèce *K. papilionacea* en particulier, celle-ci n'a été observée qu'en baie de Concarneau, d'Arcachon et surtout dans l'Etang de Diana toujours à de faibles abondances (maximum 700 cellules/L).

La Figure 49 présente les observations des *Karenia* dans l'étang de Diana de janvier 2018 à décembre 2020. La détection de brevétoxines dans les coquillages de cet étang est pointée d'une étoile rouge. Il reste à déterminer la relation entre les *Karenia* observées et les brevétoxines détectées.

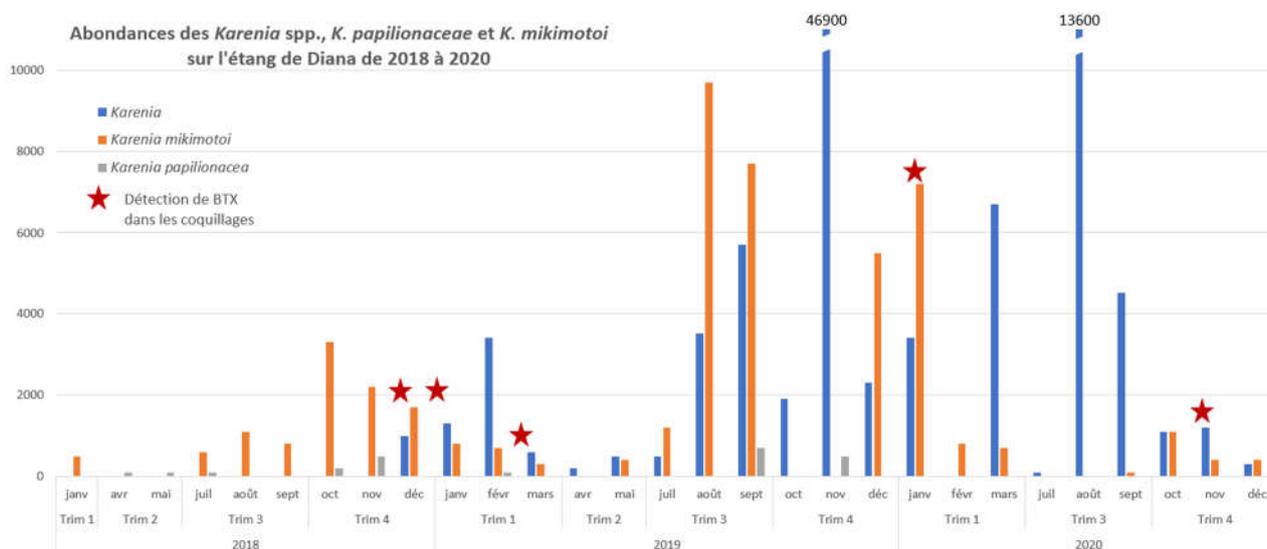


Figure 49 : Abondance mensuelles maximales des observations de *Karenia* spp. de janvier 2018 à décembre 2020 sur l'étang de Diana (Etoile rouge : détection de BTX dans les coquillages via EMERGTOX).

Le taxon *Karenia* sp. A observé en novembre 2019, présent en forte concentration, correspond à une espèce de *Karenia* qui n'est ni *K. brevis*, ni *K. papilionacea*, ni *K. mikimotoi*³⁹.

7.5 Autres pays européens

Le 17 septembre 2020, les Laboratoires Nationaux de Référence (LNR) européens ainsi que le Laboratoire de Référence de l'Union Européenne (LRUE) ont été sollicités par e-mail, afin d'obtenir des informations sur l'existence de programmes de surveillance des brevétoxines ou de *Karenia* spp. Onze pays sur les 24 destinataires de cette demande ont répondu.

Actuellement, en Europe, aucun pays ne dispose d'un programme de surveillance des brevétoxines. Néanmoins, *Karenia* spp. est suivie dans plusieurs pays.

- En Espagne, *Karenia papilionacea* a été observé en Catalogne dans le cadre d'un programme de surveillance phytoplanktonique. Toutefois, les brevétoxines n'ont pas encore fait l'objet d'un suivi (Diogene 2020, communication personnelle).

³⁹ Dans un article publié par l'Ifremer en juillet 2021, non disponible au moment de l'expertise, il est indiqué que les prélèvements d'eau réalisés sur le site de l'étang de Diana ont permis de détecter la présence de *Karenia mikimotoi*, *Karenia papilionacea*, *Karenia longicanalis*, une autre espèce de *Karenia* non identifiée, *Fibrocapsa japonica* et *Heterosigma akashiwo* (Amzil et al., 2021).

- Au Danemark, par le passé, les zones de production étaient fermées lorsque la concentration en *Karenia spp.* dans les prélèvements d'eaux était supérieure à 5.10^5 cellules/L (Lawrence *et al.* 2011). Actuellement, quel que soit le groupe de biotoxines marines recherché, les zones de production danoises sont fermées en se basant sur la teneur en toxines des moules. Les brevétoxines ne sont toutefois pas recherchées. Le phytoplancton, dont *Karenia spp.*, fait néanmoins toujours l'objet d'une surveillance (Jørgensen 2020).
- En Grèce, *Karenia spp.* est suivi depuis de nombreuses années, mais les brevétoxines n'ont jamais été recherchées (Aligizaki 2020).
- En Italie, à partir de 1976, plusieurs efflorescences algales ont été observées en Emilie-Romagne (estuaire de la rivière Pô). Une surveillance du phytoplancton et des toxines a alors été mise en place dans cette région. Les brevétoxines ont notamment été recherchées, suite à l'observation de *Karenia spp.* (Milandri 2020). Les zones de production étaient fermées lorsque les analyses de mollusques par bio-essai sur souris étaient positives en mettant en œuvre la méthode de McFarren et Bartsch (1960). De 1976 à 1987, plusieurs épisodes intenses et répétés de marée rouge ont été observés sans survenue de cas d'intoxication. A ce jour, ces mesures ne sont plus appliquées.
- Aux Pays-Bas, il n'y a pas de programme de surveillance en place. Toutefois, une étude d'occurrence des brevétoxines a été menée en 2019 (Gerssen 2020) : 317 échantillons, collectés entre janvier 2017 et février 2018 ont été analysés (216 moules, 48 huîtres, 21 coques et 32 couteaux). La BTX-1, BTX-2, BTX-3, BTX-9, BTX-B5, Cys-BTX-A, Cys-BTX-A S-oxyde et la Cys-BTX-1 glycine ont été recherchées. Les teneurs en brevétoxines dans l'ensemble des échantillons étaient inférieures à la limite de détection (150 µg/kg pour la BTX-2 et la BTX-3 et 40 µg/kg pour la BTX-9).
- Au Royaume-Uni, Turner *et al.* (2015) ont indiqué que *K. brevis* n'a pas été détecté dans les eaux mais que la présence de *K. mikimotoi* a été mise en évidence à de nombreuses reprises.

Par ailleurs, les brevétoxines font partie des toxines émergentes suivies dans le cadre d'un consortium international de onze groupes de recherche le long de l'Arc Atlantique européen. Ce projet Alertox-Net est financé par le Fonds européen de développement régional « Interreg Espace Atlantique »⁴⁰

Un questionnaire a également été adressé aux membres de l'ENDWARE afin de recueillir les différentes mesures qui auraient pu être mises en place pour suivre les espèces de *K. brevis* et les brevétoxines dans les eaux récréatives. Au 10 février 2021, il apparaît qu'en Allemagne, au Danemark, en Finlande, au Pays-Bas, au Portugal et en République Tchèque, aucun suivi de *K. brevis* n'existe pour les eaux récréatives.

7.6 Recommandation du GT pour le suivi des microalgues et des brevétoxines dans les coquillages

7.6.1 Recommandations de suivi des microalgues

Depuis 2008, la majorité des prélèvements est réalisée en sub-surface (un mètre sous la surface). Selon Brand *et al.* (2012), les dinoflagellés pélagiques se déplacent dans la colonne d'eau, ce qui implique la nécessité d'appliquer une procédure de prélèvement qui intégrerait au mieux la colonne d'eau.

⁴⁰ <https://www.alertox-net.eu/>

La pratique de trait de filets verticaux sur la colonne d'eau pourrait être mise en œuvre assez facilement, mais ne permettra pas aisément la récolte de données quantitatives. Pour obtenir des données quantitatives sur la colonne d'eau, il conviendrait d'équiper les préleveurs d'un matériel permettant d'intégrer l'eau brute de la colonne sans la concentrer. Il existe un matériel sophistiqué dont le coût est très élevé. Mais dans toutes les techniques d'intégration de l'eau de la colonne d'eau il est très difficile de les appliquer à des masses d'eau à fort courant (ce qui est le cas en Manche et en Atlantique).

L'autre option consisterait à procéder à plusieurs prélèvements à la bouteille à différents niveaux dans la colonne d'eau. Les nombres de prélèvements et les niveaux seraient à déterminer en fonction de la profondeur maximale qui diffère selon les lieux. Les différents prélèvements seraient ensuite mélangés. Le résultat du dénombrement de phytoplancton représenterait alors une moyenne des différents niveaux prélevés.

La fréquence appliquée pour le REPHY (quinzaine en routine, ou hebdomadaire en cas de dépassement du seuil d'alerte pour les microalgues productrices de phycotoxines réglementées) semble adaptée : en effet, les prélèvements de coquillages dans le cadre d'EMERGTOX étant mensuels, deux prélèvements d'eau précèdent *a minima* celui des coquillages.

Les données disponibles à ce jour sont insuffisantes pour pouvoir proposer une concentration seuil de microalgues (nombre de cellules par litre) applicable en France (plus particulièrement en Corse) dans le cadre d'EMERGTOX.

Pour pallier l'absence de seuil d'alerte pour *Karenia* spp en France, le GT recommande de passer à une fréquence hebdomadaire en cas de quantification de BTX dans les coquillages sur un lieu donné.

Concernant les analyses de l'eau, en premier lieu il s'avère nécessaire d'avoir un prélèvement d'eau brute non fixé pour pouvoir observer les cellules vivantes. En deuxième lieu, en cas de détection d'espèces cibles, il sera fait appel à une structure experte en taxinomie des microalgues.

En cas de détection de BTX dans les coquillages et compte tenu de la difficulté à identifier par microscopie optique les espèces de microalgues productrices de BTX (en particulier pour différencier *K. brevis* de *K. papilionacea*) le GT recommande l'utilisation de biologie moléculaire (amplification par PCR de plusieurs marqueurs moléculaires, au niveau des régions D1-D2 du 28S ADNr, V4 du 18S ADNr ainsi que la région intergénique ITS2).

Par ailleurs, concernant la situation en Corse, le GT recommande :

- d'isoler et de mettre en culture les espèces de microalgues potentiellement productrices de BTX ;
- d'investiguer la présence potentielle de microalgues productrices de BTX sur le ou les autre(s) site(s) de production conchylicole, y compris en mer ouverte ;
- de déterminer un seuil d'alerte en microalgues productrices de BTX (qui déclencherait des analyses de BTX dans les coquillages).

7.6.2 Recommandations de valeur guide dans les coquillages

Afin d'évaluer le niveau de protection apporté par la teneur maximale de 20 US/100 g (800 µg BTX-2/kg de chair de coquillages), le GT a comparé l'exposition liée à la consommation de coquillages contaminés à ce niveau avec les 2 « LOAEL aiguës » retenues, sur la base de plusieurs hypothèses de consommation (Tableau 20) (cf partie 5).

Tableau 20 : Evaluation du caractère protecteur de la teneur maximale de 20 US/100 g (800 µg BTX-2/kg de chair de coquillages ou 680 µg BTX-3/kg de chair de coquillages)

Hypothèses de consommation	Exposition correspondante à la consommation de coquillages contaminés à hauteur de la TM = 20 US/100 g de chair de coquillages	Dose minimale avec des symptômes (« LOAEL aiguë »)	
400 g de coquillages	80 US/personne		
Etude Consomer (huîtres) P 95 = 182,4 g P 97,5 = 255 g	36,5 US/personne 51 US/personne	0,3-0,4 US/kg p.c. (Hemmert, 1975), hypothèse d'un poids corporel de 70 kg = 21-28 US/personne Soit 1,02-1,36 µg eq BTX-3/kg p.c.	27-40,5 US/personne (calculé par le GT sur la base de McFarren <i>et al.</i> (1965)) Soit 92-138 µg eq. BTX3/personne
Etude Consomer (moules) P 95 = 200 g P 97,5 = 300 g	40 US/personne 60 US/personne		
Etude Consomer (palourdes) P 95 = 50 g P 97,5 = 60 g	10 US/personne 12 US/personne		

Les estimations reposent sur des hypothèses de calcul prises à la fois par les auteurs et par le GT, chacune assortie d'une marge d'erreur difficile à estimer. Il convient donc de considérer les valeurs du Tableau 20 avec un niveau d'incertitude moyen pour l'étude de Hemmert (1975) et fort pour l'étude de McFarren *et al.* (1965).

Sur la base de la « LOAEL aiguë » de **0,3-0,4 US/kg p.c.** rapportée par Hemmert (1975), avec l'hypothèse d'un poids corporel de 70 kg et d'une consommation par défaut protectrice de 400 g de chair de coquillages, le GT a calculé une teneur de 52,5-70 US/kg de chair de coquillages. Selon Baden et Mende (1982), 1 US = 3,4 µg BTX-3, ce qui correspondrait à une concentration de **179-228 µg eq. BTX-3/kg de chair de coquillages** (donc 3 à 4 fois plus faible que la limite de 800 µg BTX-2/kg correspondant à 680 BTX-3/kg de chair de coquillages).

Sur la base de la « LOAEL aiguë » de **27-40,5 US/personne** calculée par le GT à partir de l'étude de McFarren *et al.* (1965), avec l'hypothèse d'une consommation par défaut protectrice de 400 g de chair de coquillages, le GT a calculé une teneur de 67,5-101,25 US/kg de chair de coquillages, soit une concentration de **230-344 µg eq. BTX-3/kg de chair de coquillages** (donc 2 à 3 fois plus faible que la limite de 800 µg BTX-2/kg correspondant à 680 BTX-3/kg de chair de coquillages).

En conclusion, la teneur maximale de 20 US/100 g de chair de coquillage (équivalente à 800 BTX-2/kg de chair de coquillages) n'apparaît pas suffisamment protectrice. **Le GT recommande donc une valeur guide de 180 µg eq. BTX-3/kg de chair de coquillages (correspondant à la somme de l'ensemble des métabolites de BTX recherchés).** L'application d'un facteur de sécurité supplémentaire n'a pas été jugé nécessaire en raison des hypothèses protectrices prises pour les calculs (consommation par défaut de 400 g de chair de coquillages et un poids corporel de 70 kg).

En cas de dépassement de cette valeur guide dans des moules ou des huîtres en Corse (espèce suivie dans EMERGTOX au point de Diana, seule zone touchée par les brevétoxines en France métropolitaine à ce jour), le GT recommande :

- de faire une information active auprès des professionnels de santé pour renforcer la détection de cas potentiels d'intoxication ;
- de rechercher les BTX dans les autres espèces de coquillages produits sur la zone concernée ;
- de rechercher la présence potentielle de BTX dans les coquillages sur le ou les autre(s) site(s) de production conchylicole, y compris en mer ouverte.

Par ailleurs, le GT recommande d'identifier les périodes à risque en Corse au cours desquelles la fréquence de prélèvement des coquillages pourrait être renforcée.

En cas de pêche récréative dans la zone géographique à proximité, le GT recommande que ces résultats soient pris en compte par le gestionnaire du risque.

Ces recommandations s'appliquent aussi en cas de dépassement de cette valeur guide dans des coquillages d'autres zones de production que la Corse.

7.6.3 Recommandations sur la stratégie analytique dans les coquillages

Actuellement, dans le cadre du réseau EMERGTOX, seules les BTX-2 et BTX-3 sont recherchées via la méthode multi-toxines en LC-MS/MS qui couvre plusieurs groupes de toxines lipophiles réglementées et non réglementées au niveau européen. La mise en évidence des BTX en France depuis 2018 doit conduire à élargir la recherche à d'autres brevététoxines.

Le GT recommande de mettre en place des approches complémentaires permettant de mieux apprécier le risque sanitaire à l'égard de ces neurotoxines dans la chair totale des coquillages :

- un test ELISA pour le criblage des brevététoxines de type B des microalgues et des métabolites formés dans la chair des coquillages, Cette approche permet de prendre en compte les brevététoxines non analysables par LC-MS/MS faute de disponibilité commerciale des substances de référence correspondantes ;
- une méthode d'analyse physico-chimique ciblée spécifique aux brevététoxines dont les étalons sont disponibles en utilisant la LC-MS/MS. Le GT recommande par ailleurs de développer une méthode d'analyse permettant la recherche dans les coquillages de métabolites des brevététoxines moins lipophiles, afin de pouvoir, le cas échéant, prendre en compte ces derniers ;
- une analyse non ciblée utilisant la LC-HRMS pour disposer d'informations spectrales permettant de cerner d'éventuelles nouvelles brevététoxines et/ou nouveaux métabolites ou produits de dégradation.

La liste des brevététoxines que le GT propose comme prioritaires est constituée de : BTX-1, BTX-2, BTX-3, BTX-B1, BTX-B2, S-désoxy-BTX-B2, BTX-B3, BTX-B4(a et b).

Le GT recommande que les analyses soient réalisées sur chair totale plutôt que sur la glande digestive (pour être plus représentatif à des fins d'évaluation des risques).

7.6.4 Recommandations de suivi des toxines dissoutes

L'utilisation d'échantillonneurs passifs (*Solid phase adsorption toxin tracking* [SPATT]) et de résine (notamment la résine Diaion HP-20) permettrait le suivi *in situ* des toxines dissoutes et donc d'évaluer leur répartition spatio-temporelle. Ce système pourrait aussi être testé comme système d'alerte précoce de la présence de BTX.

7.6.5 Recommandations de surveillance épidémiologique

Le GT Toxines naturelles de la Direction des alertes et des vigilances sanitaires (DAVS) de l'Anses a élaboré début 2021 une fiche de signalement pour les Centres Antipoison et de Toxicovigilance (CAPTV) afin de recenser les cas d'intoxication par des biotoxines marines. Les brevététoxines sont incluses à cette fiche.

Ce GT rédigera également une note afin d'informer le réseau des Centres antipoison de l'émergence des brevététoxines sur le littoral français et des risques sanitaires associés, à une exposition par inhalation d'embruns ou par contact cutané ou ingestion d'eau lors de la pratique d'activités nautiques.

8 Conclusions du groupe de travail

Les brevétoxines (BTX) correspondent à une famille de biotoxines marines lipophiles comprenant une trentaine de métabolites dont la structure chimique est connue. A cela s'ajoute une trentaine d'autres métabolites dont la formule brute et la structure développée n'ont pas été caractérisées chimiquement ; ces métabolites sont généralement issus de la métabolisation par les coquillages.

Elles sont produites par des microalgues marines, principalement *Karenia brevis*. *K. brevis* n'a pas été recensée sur le littoral français métropolitain à ce jour. D'autres microalgues sont suspectées de produire des brevétoxines. C'est le cas de *K. mikimotoi*, *K. bicuneiformis*, *Chattonella marina*, *C. antiqua*, *Heterosigma akashiwo* et *Fibrocapsa japonica*. Ces espèces sont présentes sur les côtes françaises, mais leur capacité de production de brevétoxines n'a pas été confirmée, sauf pour *K. papilionacea*, dont la production de BTX-2 a été confirmée en conditions de laboratoire.

Par ailleurs, ces microalgues produisent également d'autres toxines et métabolites secondaires qui pourraient constituer un danger pour l'Homme mais qui ne font pas l'objet de cette saisine.

Question 1. Quelles sont les données toxicologiques disponibles pour les brevétoxines ? Permettent-elles à l'Anses de proposer des valeurs toxicologiques de référence aiguë et chronique par voie orale ?

Les données de la littérature sont très limitées concernant l'étude chez l'animal de la toxicité aiguë par voie orale et ne permettent pas d'identifier une dose sans effet néfaste ni une dose minimale avec effets néfastes. Le GT a identifié une seule étude réalisée chez la souris pour déterminer la dose létale à 50 % (DL₅₀) pour la BTX-2 et la BTX-3. La toxicité aiguë a été étudiée par voie intrapéritonéale et intraveineuse pour la BTX-1, la BTX-2 et la BTX-3. Les brevétoxines induisent des symptômes neurologiques centraux et périphériques, cardiovasculaires, respiratoires : ils se manifestent principalement par des fasciculations musculaires, une ataxie, une réduction de la fréquence respiratoire, des troubles de l'activité cardiaque et une réduction de la température corporelle. Des signes végétatifs – salivation, larmolement, miction et défécation – complètent le tableau neurologique.

Chez l'Homme, l'ingestion de coquillages contaminés par des BTX peut entraîner un syndrome nommé NSP pour « Neurotoxic Shellfish Poisoning ». Les symptômes débutent généralement entre 1 h et 24 h après l'ingestion et peuvent persister jusqu'à 3 jours. Le syndrome NSP se caractérise principalement par l'apparition de symptômes neurologiques et digestifs. Plus précisément. Les signes neurologiques comprennent essentiellement des paresthésies (lèvres et extrémités des membres), des vertiges, une asthénie, ainsi qu'une paralysie partielle des membres, des troubles de l'élocution, une perte de coordination et un coma dans les cas les plus graves. Une inversion de la perception de température, une mydriase ainsi que des troubles cardio-vasculaires (bradycardie, hypotension artérielle) ont également été rapportés. Les signes digestifs incluent des douleurs abdominales, nausées, vomissements et diarrhées. Aucun cas de décès n'a été rapporté à ce jour.

Quelques centaines des cas d'intoxication alimentaires ont été décrits et publiés dans des revues scientifiques internationales à comité de lecture. Ils sont survenus en Floride, en Caroline du Nord, en Nouvelle-Zélande et au Mexique. Aucun cas lié à la consommation de poissons n'a été rapporté à ce jour.

Le faible nombre de ces événements peut être expliqué par la mise en place d'une réglementation relative à la commercialisation des coquillages via une surveillance de la présence des cellules de *K. brevis* le long de la côte Est américaine en particulier du Golfe du Mexique, ainsi qu'en Australie/Nouvelle-Zélande.

A partir des données de cas d'intoxications humaines liées à la consommation de coquillages contaminés par les BTX, le GT a identifié deux doses minimales associées à des symptômes (« LOAEL aiguës ») : celle de 27-40,5 US/personne sur la base de McFarren *et al.* (1965) et celle de 0,3-0,4 US/kg pc rapportée par Hemmert (1975). En équivalent BTX-3, les LOAEL seraient de

92-138 µg eq. BTX-3/personne sur la base de McFarren *et al.* (1965) et 1,02-1,36 µg eq BTX-3/kg p.c sur la base Hemmert (1975). Ces données sont toutefois trop limitées pour pouvoir établir une valeur toxicologique de référence aiguë (ARfD).

Les données de génotoxicité disponibles ont été estimées de qualité insuffisante pour pouvoir conclure.

Compte tenu de la similitude entre les BTX et les ciguatoxines, des neurotoxines responsables de la ciguatera dont les effets peuvent perdurer pendant des mois voire des années après exposition aiguë, le GT estime que des effets à long terme faisant suite à une exposition aiguë ne peuvent pas être exclus.

A la connaissance du GT, aucune étude de toxicité par administration orale répétée n'est disponible, il n'est donc pas possible de proposer une valeur toxicologique de référence chronique.

Les informations sont également manquantes concernant le potentiel toxique des BTX sur la reproduction et le développement.

Question 2. Sur la base des données toxicologiques identifiées par l'Anses, est-il possible de proposer une valeur guide dans les coquillages au-delà de laquelle des investigations complémentaires seraient demandées dans le cadre du dispositif EMERGTOX ?

Afin d'évaluer le niveau de protection apporté par la teneur maximale de 20 US/100 g (800 µg BTX-2/kg de chair de coquillages), le GT a comparé l'exposition liée à la consommation de coquillages contaminés à ce niveau avec les 2 « LOAEL aiguës » identifiées, sur la base de plusieurs hypothèses de consommation.

Le GT a retenu la BTX-3 comme BTX de référence dans les coquillages (et non la BTX-2). La BTX-3 est la BTX de référence pour le test ELISA, elle présente une DL₅₀ plus faible que celle de la BTX-2. De plus, la BTX-2 est minoritaire dans les coquillages, en comparaison avec la BTX-3.

Sur la base de la « LOAEL aiguë » de **0,3-0,4 US/kg p.c.** rapportée par Hemmert (1975), avec l'hypothèse d'un poids corporel de 70 kg et d'une consommation par défaut protectrice de 400 g de chair de coquillages, le GT a calculé une teneur de 52,5-70 US/kg de chair de coquillages. Selon Baden et Mende (1982), 1 US = 3,4 µg BTX-3, ce qui correspondrait à une concentration de **179-238 µg eq. BTX-3/kg de chair de coquillages** (donc 3 à 4 fois plus faible que la limite de 800 µg BTX-2/kg correspondant à 680 BTX-3/kg de chair de coquillages).

Sur la base de la « LOAEL aiguë » de **27-40,5 US/personne** calculée par le GT à partir de l'étude de McFarren *et al.* (1965), avec l'hypothèse d'une consommation par défaut protectrice de 400 g de chair de coquillages, le GT a calculé une teneur de 67,5-101,25 US/kg de chair de coquillages, soit **230-344 µg eq. BTX-3/kg de chair de coquillages** (donc 2 à 3 fois plus faible que la limite de 800 µg BTX-2/kg correspondant à 680 BTX-3/kg de chair de coquillages).

Le GT estime que la teneur maximale de 800 µg BTX-2/kg de chair de coquillages n'apparaît pas suffisamment protectrice et recommande **une valeur guide de 180 µg BTX-3/kg de chair de coquillages (correspondant à la somme de l'ensemble des métabolites de BTX recherchés).**

Question 3. Quelles modalités de suivi des brevétoxines dans le milieu marin pourraient être recommandées dans le cadre du dispositif EMERGTOX ? Quelles investigations complémentaires seraient à réaliser en cas de dépassement de la valeur guide ?

Suivi des microalgues productrices de BTX

Depuis 2008, la majorité des prélèvements d'eau pour le REPHY est réalisée en sub-surface (un mètre en dessous de la surface). Le GT recommande de mettre en place une procédure de

prélèvement qui intégrerait la colonne d'eau. Cette recommandation n'est pas spécifique à cette saisine portant sur les BTX.

La fréquence appliquée pour le REPHY (quinzaine en routine, hebdomadaire en cas de dépassement du seuil d'alerte pour les microalgues productrices de phycotoxines réglementées) semble adaptée : en effet, les prélèvements de coquillages dans le cadre d'EMERGTOX étant mensuels, il y a au moins deux prélèvements d'eau précédant celui de coquillages.

Les données disponibles à ce jour sont insuffisantes pour pouvoir proposer une concentration seuil de microalgues (nombre de cellules par litre) applicable en France (plus particulièrement en Corse, seule zone touchée par les BTX en France métropolitaine à ce jour) dans le cadre d'EMERGTOX.

Pour pallier l'absence de seuil d'alerte pour *Karenia* spp en France, le GT recommande de passer à une fréquence hebdomadaire en cas de quantification de BTX dans les coquillages sur un lieu donné.

Concernant les analyses de l'eau, en premier lieu il s'avère nécessaire d'avoir un prélèvement d'eau non fixé pour pouvoir observer les cellules vivantes. En deuxième lieu, en cas de détection d'espèces cibles, il sera fait appel à une structure experte en taxinomie des microalgues.

En cas de détection de BTX dans les coquillages et compte tenu de la difficulté à identifier par microscopie optique les espèces de microalgues productrices de BTX (en particulier pour différencier *K. brevis* de *K. papilionacea*) le GT recommande l'utilisation de biologie moléculaire (amplification par PCR de plusieurs marqueurs moléculaires, au niveau des régions D1-D2 du 28S ADNr, V4 du 18S ADNr ainsi que la région intergénique ITS2).

Par ailleurs, concernant la situation en Corse, le GT recommande :

- d'isoler et de mettre en culture les espèces de microalgues potentiellement productrices de BTX ;
- de rechercher la présence potentielle de microalgues productrices de BTX sur le ou les autre(s) site(s) de production conchylicole, y compris en mer ouverte ;
- de déterminer un seuil d'alerte en microalgues productrices de BTX (qui déclencherait des analyses de BTX dans les coquillages).

Suivi des BTX dans les coquillages

Le GT recommande une valeur guide de 180 µg eq. BTX-3/kg de chair de coquillages pour la somme de l'ensemble des métabolites de BTX recherchés.

En cas de dépassement de cette valeur guide dans des moules ou des huîtres en Corse (espèce suivie dans EMERGTOX au point de Diana, seule zone touchée par les BTX en France métropolitaine à ce jour), le GT recommande :

- de faire une information active auprès des professionnels de santé pour renforcer la détection de cas potentiels d'intoxication;
- de rechercher les BTX dans les autres espèces de coquillages produits sur la zone concernée ;
- de rechercher la présence potentielle de BTX dans les coquillages sur le ou les autre(s) site(s) de production conchylicole, y compris en mer ouverte.

Par ailleurs, le GT recommande d'identifier les périodes à risque en Corse au cours desquelles la fréquence de prélèvement des coquillages pourrait être renforcée.

En cas de pêche récréative dans la zone géographique à proximité, le GT recommande que ces résultats soient pris en compte par le gestionnaire du risque.

Ces recommandations s'appliquent aussi en cas de dépassement de cette valeur guide dans des coquillages d'autres zones de production que la Corse.

Actuellement, dans le cadre du réseau EMERGTOX, seules les BTX-2 et BTX-3 sont recherchées via la méthode multi-toxines en LC-MS/MS qui cible plusieurs groupes de toxines lipophiles réglementées et non réglementées au niveau européen. La mise en évidence des BTX en France depuis 2018 doit conduire à élargir la recherche à d'autres brevétoxines.

Le GT recommande de mettre en place des approches complémentaires :

- un test ELISA pour le criblage des brevétoxines de type B des microalgues et des métabolites formés dans la chair des coquillages, cette approche permet de prendre en compte les brevétoxines non analysables par LC-MS/MS faute de disponibilité commerciale des substances de référence correspondantes ;
- une méthode d'analyse physico-chimique ciblée spécifique aux brevétoxines dont les étalons sont disponibles en utilisant la LC-MS/MS. Le GT recommande par ailleurs de développer une méthode d'analyse permettant la recherche dans les coquillages de métabolites des brevétoxines moins lipophiles, afin de pouvoir, le cas échéant, les prendre en compte ;
- une analyse non ciblée utilisant la LC-HRMS pour disposer d'informations spectrales permettant de cerner d'éventuelles nouvelles brevétoxines et/ou nouveaux métabolites ou produits de dégradation.

La liste des brevétoxines que le GT propose comme prioritaires est constituée de : BTX-1, BTX-2, BTX-3, BTX-B1, BTX-B2, S-désoxy-BTX-B2, BTX-B3, BTX-B4(a et b).

Le GT recommande que les analyses soient réalisées sur chair totale plutôt que sur la glande digestive (pour être plus représentatif à des fins d'évaluation des risques).

Suivi épidémiologique

Le GT Toxines naturelles de la Direction des alertes et des vigilances sanitaires (DAVS) de l'Anses a élaboré début 2021 une fiche de signalement pour les Centres Antipoison et de Toxicovigilance (CAPTV) afin de recenser les cas d'intoxication par des biotoxines marines. Les brevétoxines sont incluses à cette fiche, qui sera complétée dans un second temps pour les aspects liés à l'exposition aux brevétoxines par inhalation et contact cutanéomuqueux.

Question 4. Compte tenu des données toxicologiques et au vu du contexte, existe-t-il une préoccupation de santé publique aux niveaux de contamination identifiés dans certaines zones marines françaises liée à la consommation de coquillages?

Depuis la recherche des BTX dans le réseau EMERGTOX début 2018, des concentrations quantifiées ont été rapportées uniquement dans des moules de l'étang de Diana (Corse). La concentration maximale rapportée à ce jour est de 345 µg/kg de glande digestive pour la somme de BTX-2 et BTX-3 en novembre 2020 (ce qui correspond⁴¹ à une valeur estimée à 57 µg/kg de chair totale pour la somme de BTX-2 et BTX-3).

Le GT note que les concentrations des 2 BTX dans les coquillages ont augmenté de 20 µg/kg de chair total en novembre 2018, 43,8 µg/kg en janvier 2019 à 57 µg/kg en novembre 2020.

Ces données sont trop limitées pour servir de base à une estimation de l'exposition alimentaire du consommateur.

Les concentrations sont inférieures à la nouvelle valeur guide proposée par le GT (de 180 µg eq. BTX-3/kg de chair de coquillages), mais le GT souligne qu'il peut y avoir une sous-estimation de la teneur totale en BTX du fait que seules 2 BTX sur l'ensemble des métabolites potentiellement toxiques ont été analysées dans EMERGTOX.

⁴¹ En faisant l'hypothèse que les BTX se concentrent uniquement dans la glande digestive et sur la base de résultats préliminaires réalisés en 2018 et 2019 sur la chair totale.

C'est pourquoi le GT recommande d'élargir dès que possible la prise en compte des BTX suivantes : pour l'analyse par couplage LC-MS basse ou haute résolution : BTX-1, BTX-2, BTX-3, BTX-B1, BTX-B2, S-désoxy-BTX-B2, BTX-B3, BTX-B4(a et b).

Ainsi, le GT estime qu'une préoccupation sanitaire après exposition aiguë ne peut pas être exclue.

Enfin, le GT ne peut pas se prononcer sur les potentiels effets liés à une exposition répétée à des concentrations faibles.

Question 5. Existe-t-il une préoccupation sanitaire liée à l'exposition aux brevétoxines par un contact direct avec de l'eau contaminée notamment en cas de baignade ou de pratique d'activités nautiques ou en cas d'exposition par inhalation à des embruns ?

La contamination des milieux aquatiques survient principalement après la mort des cellules. Lors de la lyse cellulaire de *K. brevis*, différents analogues de BTX sont alors libérés dans la colonne d'eau. Il a été montré en conditions de laboratoire que la quantité moyenne de BTX produite *in situ* par *K. brevis* est comprise entre 8 et 30 pg par cellule (Baden et Tomas 1988 ; Pierce *et al.* 2000).

La concentration des analogues dans l'eau de mer varient selon la phase du cycle des efflorescences (croissance, stationnaire ou déclin), l'intensité des efflorescences, le site où elle se développe et les conditions environnementales (Baden et Tomas 1988 ; Baden *et al.* 2005 ; Pierce *et al.*, 2003, 2008, 2011). La BTX-2 et la BTX-3 semblent être présentes à des concentrations plus élevées dans l'écume (respectivement 1900 µg.L⁻¹ et 1200 µg.L⁻¹) que dans la colonne d'eau (zone de déferlement-respectivement 20 µg.L⁻¹ et 4 µg.L⁻¹) (Pierce *et al.* 2003).

La concentration en BTX dans les aérosols collectés sur la plage dépend quant à elle de la concentration en BTX présente dans la zone de déferlement, de la vitesse et de la direction du vent ainsi que de l'exposition de la plage (Pierce *et al.* 2003 ; Backer *et al.* 2003 ; Cheng *et al.* 2005 a et b). En fonction de la localisation des efflorescences à la surface de l'eau (« surf zone », vagues déferlantes) et de la force et vitesse du vent, les concentrations en BTX dans les aérosols varient, de même que leur distribution sur la plage et dans les terres.

Comme dans les échantillons d'eau, les BTX-1,- 2, -3 et BTX-B5 sont majoritairement retrouvés dans les aérosols. Tout comme dans la colonne d'eau, la composition en BTX dans les aérosols varie au cours des phases de l'efflorescence (Roszell *et al.* 1989). Pendant les phases stationnaires et décroissantes de l'efflorescence, les concentrations de BTX-1 et BTX-2 dans l'air diminuent considérablement et celles de BTX-3 augmentent.

Plusieurs études décrivent les symptômes observés lors de l'exposition à des embruns contenant des BTX : éternuements, rhinorrhée et irritation de la gorge (Cheng *et al.* 2004; Cheng *et al.* 2005a; 2005b; Fleming *et al.* 2005; 2007;2009 ; Milian *et al.* 2007; Pierce *et al.* 2003; 2005; 2008). Les symptômes apparaissent de quelques minutes à quelques heures (< 24 h) après l'exposition et se résorbent généralement dès que les individus quittent la zone contaminée. La localisation anatomique des symptômes suggère un dépôt de BTX dans les voies aériennes supérieures. Les symptômes se déplacent des parties supérieures vers les parties inférieures de l'arbre respiratoire et s'accroissent en fonction de l'augmentation de la concentration en BTX dans l'air (Backer *et al.* 2003). Une exposition à des concentrations atmosphériques de l'ordre de 3 à 5 ng.m⁻³ sont suffisantes pour observer des symptômes des voies respiratoires supérieures. Des concentrations en BTX de 30 à 40 ng.m⁻³ sont nécessaires pour provoquer des symptômes en lien avec une atteinte des voies respiratoires inférieures, notamment chez les personnes asthmatiques.

Les irritations respiratoires ne sont pas les seuls symptômes observés lors d'une efflorescence de *K. brevis*. Les aérosols contaminés par des BTX qui se déposent sur le visage et la peau peuvent également causer des irritations cutanées et oculaires (Kirkpatrick *et al.* 2004).

À ce jour, aucune efflorescence liée aux *Karenia brevis* n'a été identifiée sur les côtes françaises métropolitaines. Le suivi systématique de cette microalgue et/ou des brevétoxines dans le cadre du contrôle sanitaire des eaux de baignades en eau de mer n'est donc pas préconisé.

En revanche, compte tenu de la présence sur les côtes françaises métropolitaines de différents producteurs potentiels de brevétoxines, les experts recommandent la mise en place d'un système de surveillance participative, par des acteurs de terrain (association sportive, maître-nageur, etc.) basée sur une surveillance visuelle de la variation de la coloration de l'eau. Un tel système de surveillance a déjà fait ses preuves lors du suivi des cyanobactéries en eau douce (Mitroi *et al.* 2020).

Du fait de la présence de différentes espèces potentiellement productrices de brevétoxines sur les côtes françaises depuis plusieurs années **les experts préconisent, si une efflorescence de ces microalgues est mise en évidence sur les côtes françaises, d'instaurer les mesures suivantes :**

- Identifier les espèces présentes dans l'efflorescence ;
- Si la présence de producteur de brevétoxines est avérée :
 - o estimer les abondances cellulaires et les concentrations en toxines dans l'eau et dans l'air ;
 - o interdire la baignade et la pratique des activités de loisirs nautiques à proximité de l'efflorescence ;
 - o recommander le port de protections respiratoires (masques) à proximité des plages affectées ;
 - o informer les populations à risque et notamment les personnes asthmatiques et les femmes enceintes des risques liés à la présence d'efflorescence de ces microalgues ;
 - o en cas de contact avec ces microalgues et de sensation d'irritation, sortir de l'eau et se rincer soigneusement avec de l'eau ;
 - o sensibiliser les professionnels de santé susceptibles de rencontrer des personnes présentant des symptômes évocateurs d'une intoxication par les BTX (médecins généralistes, urgentistes, SAMU, CAPTV).

Suivi épidémiologique

La présence de brevétoxines dans les eaux marines françaises est une problématique émergente peu connue des professionnels de santé et de la population générale. Une fiche d'information et de signalement devrait être mise à disposition des différents acteurs professionnels de santé et de tourisme (écoles de loisirs nautiques, centres de plongée, postes de secours des plages, préleveurs d'eau du contrôle sanitaire des eaux de baignade, retraités, pharmacies du bord de mer, médecins, centre Anti-Poison, etc.)

Cette note d'information rédigée par l'Anses permettra d'informer le réseau des Centres antipoison de l'émergence des BTX et des risques sanitaires encourus sur le littoral français lors d'une exposition par inhalation d'embruns ou par contact cutané ou ingestion d'eau lors de la pratique d'activités nautiques.

9 Besoins de recherche

Le GT a identifié un manque de connaissances et recommande les pistes de recherche suivantes.

Concernant les données de toxicité

- L'effet des BTX doit faire l'objet d'une étude de toxicité orale aiguë selon la ligne directrice 424 de l'OCDE (OCDE 1997a) pour l'étude de la neurotoxicité (administration unique, période d'observation de 14 jours), chez le rongeur, permettant la description de l'ensemble symptômes cliniques visibles (en particulier les altérations du comportement telles que l'hyper-réactivité), l'évaluation la plus complète de paramètres biologiques (paramètres respiratoires et cardiovasculaires, suivi de la température interne, effets gastro-intestinaux) pour déterminer la relation dose-effet. Une telle étude permettra de définir un effet critique d'intoxication aiguë, permettant d'identifier une dose sans effet comme point de départ pour dériver une valeur toxicologique de référence. Cette recommandation s'applique en priorité à la BTX-3, et dans un second temps aux autres BTX majoritaires dans les coquillages.
- Une étude comparable devrait être menée par exposition aux BTX par voie respiratoire.
- Afin d'obtenir des résultats fiables et consolidés concernant le potentiel mutagène et génotoxique de BTX, la stratégie selon une approche par étapes telle que recommandée par l'EFSA (2011) doit être mise en œuvre, en commençant par la batterie de base de tests *in vitro* suivante : 1) un test d'Ames⁴² (essai de mutation reverse bactérienne) selon la ligne directrice 471 de l'OCDE, 2) une étude d'aberrations chromosomiques, préférentiellement le test *in vitro* du micronoyau selon la ligne directrice 487 de l'OCDE. La BTX considérée comme la plus pertinente en tant que BTX de référence devant faire l'objet de cette évaluation est la BTX-3. Le potentiel des autres métabolites majoritaires présents dans les coquillages devrait également être investigué.
- Il conviendrait d'acquérir des données toxico-cinétiques de la BTX-3 par exposition orale chez le rongeur selon la ligne directrice de l'OCDE 417 (OCDE 2010).
- Des études de toxicité subaiguë/subchronique doivent également être envisagées. Elles seront réalisées par administration orale répétée, de 28 ou 90 jours sur rongeur selon les lignes directrices 424, 407 ou 408 de l'OCDE. Cette recommandation s'applique prioritairement à la BTX-3, et dans un second temps aux autres BTX majoritaires dans les coquillages. La toxicité chronique des BTX doit également être considérée dans des études chez le rongeur.
- Le caractère toxique des brevétoxines pour le développement et le neuro-développement doit faire l'objet d'une étude visant à identifier les conséquences d'une exposition de femelles gestantes aux brevétoxines par voie orale sur sa descendance (lignes directrices de l'OCDE 414 et 426).
- Les métabolites présents dans les coquillages pour lesquels il n'y a pas de données sur le potentiel toxique devraient être isolés et identifiés (élucider leur structure chimique). Ils devraient être produits en quantité suffisante pour pouvoir étudier leur potentiel toxique *in vitro* (RBA et/ou neuro-2a).
- Des études de toxicité relative par rapport à la BTX-3 pour les BTX majoritaires dans les coquillages devraient être réalisées pour déterminer des facteurs d'équivalence toxique (TEF).

⁴² Une attention particulière devra être portée en cas d'un test négatif avec une dose maximale analysable < 250 µg/boîte, qui est la limite de sensibilité estimée pour la plupart des mutagènes pertinents dans le test d'Ames. Dans ce cas, le test d'Ames devra être considéré comme insuffisamment pertinent et le potentiel d'induction de mutation génique devra être évalué sur des cellules de mammifères par exemple, à l'aide du test MLA/TK (OCDE 1997b).

- L'effet des mélanges de métabolites mériterait d'être investigué.
- L'étude d'exposition par inhalation chez les rongeurs devrait être poursuivie en recherchant l'ensemble des signes d'intoxication (neurotoxiques, musculaires, cardiovasculaires, thermiques) observés avec d'autres voies d'exposition (oral, i.p).
- Des études pour déterminer les effets d'une exposition par contact cutané d'une eau ou d'aérosols contaminés par les brevétoxines devraient être mises en place.
- La toxicité des métabolites BTX pour une exposition à court, moyen et long terme via le contact cutané ou l'inhalation devrait être étudiée.

Concernant les méthodes analytiques, il conviendrait :

- de produire et de rendre disponible un plus grand nombre d'étalons et de matériaux de référence de brevétoxines et de leurs métabolites.
- de développer des méthodes d'analyse physico-chimiques basées sur la spectrométrie de masse et permettant d'ajouter aux brevétoxines natives leurs métabolites les plus polaires, afin de pouvoir les prendre en compte lorsqu'ils sont présents dans les coquillages.
- de mener des études de validation intra- inter-laboratoires en bonne et due forme (AOAC ou ISO) afin d'apprécier la fiabilité des méthodes physico-chimiques, biochimiques et biologiques.
- Le développement des méthodes analytiques est nécessaire pour la recherche de BTX dans les échantillons d'urine ou de sang pour confirmer les cas d'intoxication humaine.

Concernant la surveillance

- Il conviendrait d'étudier la cinétique de contamination/décontamination des coquillages par les BTX (avec des sources de microalgues productrices de BTX identifiées en Corse).
- Une étude écophysiologique des microalgues productrices de BTX identifiées en Corse est recommandée en vue de déterminer les facteurs environnementaux favorisant la prolifération cellulaire et la production de toxines.
- Des travaux de recherche permettant une meilleure compréhension des conditions de développement des espèces productrices de brevétoxines et la confirmation de leur capacité à produire ces toxines doivent être entrepris ;
- Il est nécessaire de recueillir des données d'occurrence des différentes espèces de producteurs potentiels de brevétoxines dans les territoires ultra-marins (en particulier les Caraïbes) et d'étudier la contamination des coquillages ;
- L'étude des toxines dissoutes avec des échantillonneurs passifs (qui donnent une vision intégrative de la situation) permettrait de mieux identifier les zones impactées.
- Le GT recommande de rechercher s'il y a des mortalités de poissons associées dans les zones géographiques proches. Il serait pertinent d'analyser des échantillons de poissons prélevés dans la zone impactée par la présence de BTX (muscles et foies).
- En cas de survenue de cas d'intoxication alimentaire par les BTX, un suivi des patients permettrait de détecter un éventuel effet persistant (séquelles).
- Un suivi environnemental des sites de baignade situés à proximité des points de surveillance du REPHY ayant mis en évidence les années précédentes la présence de producteurs de brevétoxines devrait être mis en place. Ces prélèvements et analyses réguliers d'eau et d'air permettraient de recueillir des données afin de définir, par la suite, si un risque lié à la présence de brevétoxines existe en France dans les eaux récréatives et/ou dans les embruns.
- Une base de données communes au REPHY, à la DCSMM, Sise baignade permettrait de mutualiser les informations relatives à la qualité des eaux de baignade et de prévoir l'apparition de dangers émergents dans les eaux récréatives françaises.

- Les travaux de Tester *et al.* (2008) montrant une corrélation entre l'abondance de *K. brevis* et la chlorophylle-a dès que la concentration cellulaire en *K. brevis* est supérieure à 5000 cell.L⁻¹ sont à confirmer.

- Pour la baignade et les activités récréatives, si un épisode d'efflorescence est détecté en France, il conviendrait :
 - o de mettre en place un suivi environnemental afin de comprendre les conditions de transport des aérosols (à proximité de l'efflorescence et le cheminement à l'intérieur des terres) ;
 - o de collecter des données de concentration de toxines dans l'air afin d'établir des relations dose-réponse ;
 - o de déterminer un seuil d'alerte dans l'eau pour les différents producteurs de brevétoxines et/ou une concentration limite en brevétoxines dans l'eau.

Concernant les mesures de protection, un masque chirurgical serait suffisant pour limiter l'exposition aux embruns contaminés. Cependant, il est reconnu que pour se protéger de particules présentes dans les aérosols, l'usage d'une protection respiratoire de type FFP2 est beaucoup plus efficace. Une étude de l'efficacité des différents types de masque est à réaliser selon la population visée (population générale, professionnel, personne asthmatique, *etc.*).

Date de validation du rapport d'expertise collective par le groupe de travail (le 29 janvier 2021) par le CES ERCA pour les questions 1 à 4 (le 10 février 2021), par le CES « Eaux » pour la question 5 (le 06 juillet 2021).

10 Bibliographie

10.1 Bibliographie pour les questions 1 à 4

- Abraham, A., K. R. El Said et L. J. Flewelling. 2018. "Role of Biomarkers in Monitoring Brevetoxins in *Karenia brevis* Exposed Shellfish." *Food Saf (Tokyo)* 6 (1): 33-43. <https://doi.org/10.14252/foodsafetyfscj.2017021>.
- Abraham, A., K. R. El Said, Y. Wang, E. L. E. Jester, S. M. Plakas, L. J. Flewelling, M. S. Henry et R. H. Pierce. 2015. "Biomarkers of brevetoxin exposure and composite toxin levels in hard clam (*Mercenaria* sp.) exposed to *Karenia brevis* blooms." *Toxicon* 96: 82-88. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.01.014>.
- Abraham, A., S. M. Plakas, L. J. Flewelling, K. R. El Said, E. L. E. Jester, H. R. Granade, K. D. White et R. W. Dickey. 2008. "Biomarkers of Neurotoxic Shellfish Poisoning." *Toxicon* 52 (2): 237-245. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.04.175>.
- Abraham, A., S. M. Plakas, Z. Wang, E. L. E. Jester, K. R. El Said, H. R. Granade, M. S. Henry, P. C. Blum, R. H. Pierce et R. W. Dickey. 2006. "Characterization of polar brevetoxin derivatives isolated from *Karenia brevis* cultures and natural blooms." *Toxicon* 48 (1): 104-115. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.04.015>.
- Abraham, A., Y. Wang, K. R. El Said et S. M. Plakas. 2012. "Characterization of brevetoxin metabolism in *Karenia brevis* bloom-exposed clams (*Mercenaria* sp.) by LC-MS/MS." *Toxicon* 60 (6): 1030-40. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.06.016>.
- Abraham, Ann, Leanne J. Flewelling, Kathleen R. El Said, William Odom, Stephen P. Geiger, April A. Granholm, Jennifer T. Jackson et Dean Bodager. 2021. "An occurrence of neurotoxic shellfish poisoning by consumption of gastropods contaminated with brevetoxins." *Toxicon* 191: 9-17. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.12.010>.
- Abraham, W. M., A. J. Bourdelais, J. R. Sabater, A. Ahmed, T. A. Lee, I. Serebriakov et D. G. Baden. 2005. "Airway responses to aerosolized brevetoxins in an animal model of asthma." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 171 (1): 26-34. <https://doi.org/10.1164/rccm.200406-735OC>.
- Abraham, William M et Daniel G Baden. 2006. "Aerosolized Florida red tide toxins and human health effects." *Oceanography (Washington, DC)* 19 (2): 107.
- Adl, S. M., D. Bass, C. E. Lane, J. Lukes, C. L. Schoch, A. Smirnov, S. Agatha, C. Berney, M. W. Brown, F. Burki, P. Cardenas, I. Cepicka, L. Chistyakova, J. Del Campo, M. Dunthorn, B. Edvardsen, Y. Eglit, L. Guillou, V. Hampl, A. A. Heiss, M. Hoppenrath, T. Y. James, A. Karnkowska, S. Karpov, E. Kim, M. Kolisko, A. Kudryavtsev, D. J. G. Lahr, E. Lara, L. Le Gall, D. H. Lynn, D. G. Mann, R. Massana, E. A. D. Mitchell, C. Morrow, J. S. Park, J. W. Pawlowski, M. J. Powell, D. J. Richter, S. Rueckert, L. Shadwick, S. Shimano, F. W. Spiegel, G. Torruella, N. Youssef, V. Zlatogursky et Q. Zhang. 2019. "Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes." *J Eukaryot Microbiol* 66 (1): 4-119. <https://doi.org/10.1111/jeu.12691>.
- Adl, S. M., A. G. Simpson, C. E. Lane, J. Lukeš, D. Bass, S. S. Bowser, M. W. Brown, F. Burki, M. Dunthorn, V. Hampl, A. Heiss, M. Hoppenrath, E. Lara, L. Le Gall, D. H. Lynn, H. McManus, E. A. Mitchell, S. E. Mozley-Stanridge, L. W. Parfrey, J. Pawlowski, S. Rueckert, L. Shadwick, C. L. Schoch, A. Smirnov et F. W. Spiegel. 2012. "The revised classification of eukaryotes." *J Eukaryot Microbiol* 59 (5): 429-93. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x>.
- Aligizaki, Katerina. 2020. "Greece monitoring program of brevetoxins ", 12 novembre 2020.
- Amzil, Zouher, Amélie Derrien, Aouregan Terre Terrillon, Audrey Duval, Coralie Connes, Françoise Marco-Miralles, Elisabeth Nézan et Kenneth Neil Mertens. 2021. "Monitoring the Emergence of Algal Toxins in Shellfish: First Report on Detection of Brevetoxins in French Mediterranean Mussels." *Marine Drugs* 19 (7): 393.
- Aquino-Cruz, A, CJ Band-Schmidt et T Zenteno-Savín. 2020. "Superoxide production rates and hemolytic activity linked to cellular growth phases in *Chattonella* species (Raphidophyceae) and *Margalefidinium polykrikoides* (Dinophyceae)." *Journal of Applied Phycology* 32 (6): 4029-4046.

- Astuya, Allisson, Alejandra E Ramirez, Ambar Aballay, Juan Araya, Janette Silva, Viviana Ulloa et Jorge Fuentealba. 2015. "Neurotoxin-like compounds from the ichthyotoxic red tide alga *Heterosigma akashiwo* induce a TTX-like synaptic silencing in mammalian neurons." *Harmful algae* 47: 1-8.
- Atchison, W. D., V. S. Luke, T. Narahashi et S. M. Vogel. 1986. "Nerve membrane sodium channels as the target site of brevetoxins at neuromuscular junctions." *British Journal of Pharmacology* 89 (4): 731-738. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1986.tb11177.x>.
- Backer, Lorraine C, Lora E Fleming, Alan Rowan, Yung-Sung Cheng, Janet Benson, Richard H Pierce, Julia Zaias, Judy Bean, Gregory D Bossart et David Johnson. 2003. "Recreational exposure to aerosolized brevetoxins during Florida red tide events." *Harmful Algae* 2 (1): 19-28.
- Baden, D. G., G. Bikhazi, S. J. Decker, F. F. Foldes et I. Leung. 1984. "Neuromuscular blocking action of two brevetoxins from the Florida red tide organism *Ptychodiscus brevis*." *Toxicon* 22 (1): 75-84. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(84\)90140-5](https://doi.org/10.1016/0041-0101(84)90140-5).
- Baden, D. G., A. J. Bourdelais, H. Jacocks, S. Michelliza et J. Naar. 2005. "Natural and derivative brevetoxins: Historical background, multiplicity, and effects." *Environmental Health Perspectives* 113 (5): 621-625. <https://doi.org/10.1289/ehp.7499>.
- Baden, D. G. et C. R. Tomas. 1988. "Variations in major toxin composition for six clones of *Ptychodiscus brevis*." *Toxicon* 26 (10): 961-963. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(88\)90261-9](https://doi.org/10.1016/0041-0101(88)90261-9).
- Baden, Daniel G et Thomas J Mende. 1982. "Toxicity of two toxins from the Florida red tide marine dinoflagellate, *Ptychodiscus brevis*." *Toxicon* 20 (2): 457-461.
- Baden, Daniel G., Thomas J. Mende, George Bikhazi et Ignatius Leung. 1982. "Bronchoconstriction caused by Florida red tide toxins." *Toxicon* 20 (5): 929-932. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0041-0101\(82\)90081-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0041-0101(82)90081-2).
- Baden, DG, TJ Mende et RE Block. 1979. "Two similar toxins isolated from *Gymnodinium breve*." Dans *Toxic dinoflagellate blooms*, 327-334. : Elsevier New York.
- Band-Schmidt, C. J., A. Martínez-López, J. J. Bustillos-Guzmán, L. Carreón-Palau, L. Morquecho, N. O. Olguín-Monroy, T. Zenteno-Savín, A. Mendoza-Flores, B. González-Acosta, F. H. Hernández-Sandoval et C. Tomas. 2012. "Morphology, biochemistry, and growth of raphidophyte strains from the Gulf of California." *Hydrobiologia* 693 (1): 81-97. <https://doi.org/10.1007/s10750-012-1088-y>.
- Belin, Catherine et Nadine Neaud-Masson. 2017. *Cahier de Procédures REPHY. Document de prescription. Version 1.* <https://doi.org/10.13155/50389>.
- Benson, J. M., A. P. Gomez, G. L. Statom, B. M. Tibbetts, L. E. Fleming, L. C. Backer, A. Reich et D. G. Baden. 2006. "Placental transport of brevetoxin-3 in CD-1 mice." *Toxicon* 48 (8): 1018-1026. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.08.008>.
- Benson, J. M., D. L. Tischler et D. G. Baden. 1999. "Uptake, tissue distribution, and excretion of brevetoxin 3 administered to rats by intratracheal instillation." *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A* 57 (5): 345-355. <https://doi.org/10.1080/009841099157656>.
- Bercel, T. L. et S. A. Kranz. 2019. "Insights into carbon acquisition and photosynthesis in *Karenia brevis* under a range of CO₂ concentrations." *Progress in Oceanography* 172: 65-76. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2019.01.011>.
- Biecheler, B. 1936. "Sur une chloromonadine nouvelle d'eau sumatre *Chattonella subsalsa* n. gen., n. sp." *Arch. Zool. Exper. Gen.* 78: 79-83.
- Black, Joel A et Stephen G Waxman. 2013. "Noncanonical roles of voltage-gated sodium channels." *Neuron* 80 (2): 280-291.
- Blunt, John W., Brent R. Copp, Robert A. Keyzers, Murray H. G. Munro et Michèle R. Prinsep. 2012. "Marine natural products." *Natural Product Reports* 29 (2): 144-222. <https://doi.org/10.1039/C2NP00090C>.
- Borison, H. L., L. E. McCarthy et S. Ellis. 1985. "Neurological analysis of respiratory, cardiovascular and neuromuscular effects of brevetoxin in cats." *Toxicon* 23 (3): 517-524. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(85\)90036-4](https://doi.org/10.1016/0041-0101(85)90036-4).
- Bossart, G. D., D. G. Baden, R. Y. Ewing, B. Roberts et S. D. Wright. 1998. "Brevetoxicosis in manatees (*Trichechus manatus latirostris*) from the 1996 epizootic: Gross, histologic, and

- immunohistochemical features." *Toxicologic Pathology* 26 (2): 276-282. <https://doi.org/10.1177/019262339802600214>.
- Bossart, G. D., D. G. Baden, R. Y. Ewing et S. D Wright. 2002. "Manatees and brevetoxicosis." Dans *Molecular and cell biology of marine mammals*, édité par C. J. Pfeiffer, 205-212.
- Botes, Lizeth, Stuart D Sym et Grant C Pitcher. 2003. "Karenia cristata sp. nov. and Karenia bicuneiformis sp. nov. (Gymnodiniales, Dinophyceae): two new Karenia species from the South African coast." *Phycologia* 42 (6): 563-571.
- Bott, M. 2014. *Marine Biotoxin contingency plan 2014 update*. <https://www.issc.org/Data/Sites/1/media/deleware%202014%20biotoxin%20plan.pdf>.
- Bottein Dechraoui, M. Y. et J. S. Ramsdell. 2003. "Type B brevetoxins show tissue selectivity for voltage-gated sodium channels: Comparison of brain, skeletal muscle and cardiac sodium channels." *Toxicon* 41 (7): 919-927. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(03\)00088-6](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(03)00088-6).
- Bottein Dechraoui, M. Y., J. J. Wacksman et J. S. Ramsdell. 2006. "Species selective resistance of cardiac muscle voltage gated sodium channels: Characterization of brevetoxin and ciguatoxin binding sites in rats and fish." *Toxicon* 48 (6): 702-712. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.07.032>.
- Bottein Dechraoui, M. Y., Z. Wang et J. S. Ramsdell. 2007. "Intrinsic potency of synthetically prepared brevetoxin cysteine metabolites BTX-B2 and desoxyBTX-B2." *Toxicon* 50 (6): 825-834. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.06.013>.
- Bottein, M. Y., J. M. Fuquay, R. Munday, A. I. Selwood, R. van Ginkel, C. O. Miles, J. I. Loader, A. L. Wilkins et J. S. Ramsdell. 2010. "Bioassay methods for detection of N-palmitoylbrevetoxin-B2 (BTX-B4)." *Toxicon* 55 (2-3): 497-506. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.09.022>.
- Bottein, Marie-Yasmine Dechraoui et Rachel J Clausing. 2017. "Receptor-binding assay for the analysis of marine toxins: detection and mode of action." *Comprehensive Analytical Chemistry; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands* 78: 277-295.
- Bottein, Marie-Yasmine Dechraoui, Lizabeth Kashinsky, Zhihong Wang, Charles Littnan et John S Ramsdell. 2011. "Identification of ciguatoxins in Hawaiian monk seals *Monachus schauinslandi* from the northwestern and main Hawaiian Islands." *Environmental science & technology* 45 (12): 5403-5409.
- Bourdelaïs, A. J., S. Campbell, H. Jacocks, J. Naar, J. L. C. Wright, J. Carsi et D. G. Baden. 2004. "Brevenal is a natural inhibitor of brevetoxin action in sodium channel receptor binding assays." *Cellular and Molecular Neurobiology* 24 (4): 553-563. <https://doi.org/10.1023/B:CEMN.0000023629.81595.09>.
- Bourdelaïs, A. J., H. M. Jacocks, J. L. C. Wright, P. M. Bigwarfe Jr et D. G. Baden. 2005. "A new polyether ladder compound produced by the dinoflagellate *Karenia brevis*." *Journal of Natural Products* 68 (1): 2-6. <https://doi.org/10.1021/np049797o>.
- Bourdelaïs, A. J., C. R. Tomas, J. Naar, J. Kubanek et D. G. Baden. 2002. "New fish-killing alga in coastal Delaware produces neurotoxins." *Environmental Health Perspectives* 110 (5): 465-470. <https://doi.org/10.1289/ehp.02110465>.
- Bowers, Holly A, Carmelo Tomas, Torstein Tengs, Jason W Kempton, Alan J Lewitus et David W Oldach. 2006. "Raphidophyceae [Chadefaud ex Silva] systematics and rapid identification: sequence analyses and real-time PCR assays." *Journal of phycology* 42 (6): 1333-1348.
- Brackenbury, William J. 2012. "Voltage-gated sodium channels and metastatic disease." *Channels* 6 (5): 352-361.
- Brand, L. E., L. Campbell et E. Bresnan. 2012. "Karenia: The biology and ecology of a toxic genus." *Harmful Algae* 14: 156-178. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.020>.
- Breier, CF et EJ Buskey. 2007. "Effects of the red tide dinoflagellate, *Karenia brevis*, on grazing and fecundity in the copepod *Acartia tonsa*." *Journal of plankton research* 29 (2): 115-126.
- Bricelj, V. M., A. G. Haubois, M. R. Sengco, R. H. Pierce, J. K. Culter et D. M. Anderson. 2012. "Trophic transfer of brevetoxins to the benthic macrofaunal community during a bloom of the harmful dinoflagellate *Karenia brevis* in Sarasota Bay, Florida." *Harmful Algae* 16: 27-34. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2012.01.001>.
- Brousseau, J. L., N. Vibet, R. M. Leblanc, K. S. Rein et D. G. Baden. 1998. "UV-visible and inelastic electron tunneling spectroscopies of brevetoxins." *Applied Spectroscopy* 52 (4): 523-527. <https://doi.org/10.1366/0003702981944067>.

- Brovedani, Valentina, Marco Pelin, Elisabetta D'Orlando et Mark Poli. 2016. "Brevetoxins: Toxicological Profile."
- Brown, A. F. M., Q. Dortch, F. M. Van Dolah, T. A. Leighfield, W. Morrison, A. E. Thessen, K. Steidinger, B. Richardson, C. A. Moncreiff et J. R. Pennock. 2006. "Effect of salinity on the distribution, growth, and toxicity of *Karenia* spp." *Harmful Algae* 5 (2): 199-212. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2005.07.004>.
- Buttke, D. E., A. Walker, I. S. Huang, L. Flewelling, J. Lankton, A. E. Ballmann, T. Clapp, J. Lindsay et P. V. Zimba. 2018. "Green tree frog (*Hyla cinerea*) and ground squirrel (*Xeroperophilus spilosoma*) mortality attributed to inland Brevetoxin transport at Padre Island National seashore, Texas, USA, 2015." *Journal of Wildlife Diseases* 54 (1): 142-146. <https://doi.org/10.7589/2017-01-018>.
- Cao, Z., J. George, W. H. Gerwick, D. G. Baden, J. D. Rainier et T. F. Murray. 2008. "Influence of lipid-soluble gating modifier toxins on sodium influx in neocortical neurons." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 326 (2): 604-613. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.138230>.
- Capper, A., L. J. Flewelling et K. Arthur. 2013. "Dietary exposure to harmful algal bloom (HAB) toxins in the endangered manatee (*Trichechus manatus latirostris*) and green sea turtle (*Chelonia mydas*) in Florida, USA." *Harmful Algae* 28: 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2013.04.009>.
- Carreira, Erick M. et Christian Ebner. 2016. "Synthesis of Gymnocin-A." *Synfacts* 12 (02): 0111-0111.
- Caruana, Amandine MN et Zouher Amzil. 2018. "Microalgae and toxins." Dans *Microalgae in Health and Disease Prevention*, 263-305. : Elsevier.
- Castle, K. T., L. J. Flewelling, J. Bryan, 2nd, A. Kramer, J. Lindsay, C. Nevada, W. Stablein, D. Wong et J. H. Landsberg. 2013. "Coyote (*Canis latrans*) and domestic dog (*Canis familiaris*) mortality and morbidity due to a *Karenia brevis* red tide in the Gulf of Mexico." *J Wildl Dis* 49 (4): 955-64. <https://doi.org/10.7589/2012-11-299>.
- Catterall, W. A. et M. Gainer. 1985. "Interaction of brevetoxin A with a new receptor site on the sodium channel." *Toxicon* 23 (3): 497-504. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(85\)90034-0](https://doi.org/10.1016/0041-0101(85)90034-0).
- Cattet, M. et J. R. Geraci. 1993. "Distribution and elimination of ingested brevetoxin (PbTx-3) in rats." *Toxicon* 31 (11): 1483-1486. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(93\)90214-4](https://doi.org/10.1016/0041-0101(93)90214-4).
- Chang, F. Hoe, Colin Anderson et Nelson C Boustead. 1990. "First record of a Heterosigma (*Raphidophyceae*) bloom with associated mortality of cage-reared salmon in Big Glory Bay, New Zealand." *New Zealand journal of marine and freshwater research* 24 (4): 461-469.
- Cheng, Y. S., J. D. McDonald, D. Kracko, C. M. Irvin, Y. Zhou, R. H. Pierce, M. S. Henry, A. Bourdelais, J. Naar et D. G. Baden. 2005a. "Concentration and particle size of airborne toxic algae (brevetoxin) derived from ocean red tide events." *Environmental Science and Technology* 39 (10): 3443-3449. <https://doi.org/10.1021/es048680j>.
- Cheng, Y. S., T. A. Villareal, Y. Zhou, J. Gao, R. H. Pierce, D. Wetzel, J. Naar et D. G. Baden. 2005b. "Characterization of red tide aerosol on the Texas coast." *Harmful Algae* 4 (1): 87-94. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2003.12.002>.
- Cheng, Y. S., Y. Zhou, C. M. Irvin, R. H. Pierce, J. Naar, L. C. Backer, L. E. Fleming, B. Kirkpatrick et D. G. Baden. 2005c. "Characterization of marine aerosol for assessment of human exposure to brevetoxins." *Environmental Health Perspectives* 113 (5): 638-643. <https://doi.org/10.1289/ehp.7496>.
- Choich, J., J. D. Salierno, E. K. Silbergeld et A. S. Kane. 2004. "Altered brain activity in brevetoxin-exposed bluegill, *Lepomis macrochirus*, visualized using in vivo ¹⁴C 2-deoxyglucose labeling." *Environmental Research* 94 (2): 192-197. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2003.07.009>.
- Chou, H. N. et Y. Shimizu. 1982. "A new polyether toxin from *Gymnodinium breve* Davis." *Tetrahedron Letters* 23 (52): 5521-5524. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)85883-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)85883-9).
- Cochlan, William P, Vera L Trainer, Charles G Trick, Mark L Wells, Brian D Bill et Bich-Thuy L Eberhart. 2013. "Heterosigma akashiwo in the Salish Sea: defining growth and toxicity leading to fish kills." Proceedings of the 15th International Conference on Harmful Algae.
- Cocilova, C. C., L. J. Flewelling, G. D. Bossart, A. A. Granholm et S. L. Milton. 2017. "Tissue uptake, distribution and excretion of brevetoxin-3 after oral and intratracheal exposure in the

- freshwater turtle *Trachemys scripta* and the diamondback terrapin *Malaclemys terrapin*." *Aquatic Toxicology* 187: 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.03.003>.
- Cocilova, C. C., L. J. Flewelling, A. A. Granholm, C. A. Manire et S. L. Milton. 2019. "Intravenous lipid emulsion treatment reduces symptoms of brevetoxicosis in turtles (*trachemys scripta*)." *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 50 (1): 33-44. <https://doi.org/10.1638/2018-0032>.
- Cocilova, C. C. et S. L. Milton. 2016. "Characterization of brevetoxin (PbTx-3) exposure in neurons of the anoxia-tolerant freshwater turtle (*Trachemys scripta*)." *Aquatic Toxicology* 180: 115-122. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.09.016>.
- Cohen, J. H., P. A. Tester et R. B. Forward Jr. 2007. "Sublethal effects of the toxic dinoflagellate *Karenia brevis* on marine copepod behavior." *Journal of Plankton Research* 29 (3): 301-315. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbm016>.
- Colman, J. R. et J. S. Ramsdell. 2003. "The type B brevetoxin (PbTx-3) adversely affects development, cardiovascular function, and survival in Medaka (*Oryzias latipes*) embryos." *Environ Health Perspect* 111 (16): 1920-5. <https://doi.org/10.1289/ehp.6386>.
- Corcoran, A. A., B. Richardson et L. J. Flewelling. 2014. "Effects of nutrient-limiting supply ratios on toxin content of *Karenia brevis* grown in continuous culture." *Harmful Algae* 39: 334-341. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.08.009>.
- Daugbjerg, N., G. Hansen, J. Larsen et Ø Moestrup. 2000. "Phylogeny of some of the major genera of dinoflagellates based on ultrastructure and partial LSU rDNA sequence data, including the erection of three new genera of unarmoured dinoflagellates." *Phycologia* 39 (4): 302-317. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-39-4-302.1>.
- de Boer, M. K., C. Boérée, S. B. Sjollem, T. de Vries, A. D. Rijnsdorp et A. G. J. Buma. 2012. "The toxic effect of the marine raphidophyte *Fibrocapsa japonica* on larvae of the common flatfish sole (*Solea solea*)." *Harmful Algae* 17: 92-101. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2012.03.005>.
- De Lera Ruiz, M. et R. L. Kraus. 2015. "Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications." *Journal of Medicinal Chemistry* 58 (18): 7093-7118. <https://doi.org/10.1021/jm501981g>.
- De Salas, M. F., C. J. S. Bolch et G. M. Hallegraeff. 2004. "*Karenia umbella* sp nov (Gymnodiniales, Dinophyceae), a new potentially ichthyotoxic dinoflagellate species from Tasmania, Australia." *Phycologia* 43 (2): 166-175. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-43-2-166.1>.
- Dechraoui, M. Y. B., J. A. Tiedeken, R. Persad, Z. Wang, H. R. Granade, R. W. Dickey et J. S. Ramsdell. 2005. "Use of two detection methods to discriminate ciguatoxins from brevetoxins: Application to great barracuda from Florida Keys." *Toxicon* 46 (3): 261-270. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.04.006>.
- Dechraoui, M. Y., J. Naar, S. Pauillac et A. M. Legrand. 1999. "Ciguatoxins and brevetoxins, neurotoxic polyether compounds active on sodium channels." *Toxicon* 37 (1): 125-143. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(98\)00169-X](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00169-X).
- Derby, M. L., M. Galliano, J. J. Krzanowski et D. F. Martin. 2003. "Studies of the effect of Ψ -APONIN from *Nannochloris* sp. on the Florida red tide organism *Karenia brevis*." *Toxicon* 41 (2): 245-249. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00285-4](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00285-4).
- Derrien, Amelie, Clementine Martin, Aouregan Terre Terrillon, Audrey Duval, Manoella Sibat et Zouher Amzil. 2018. "Dossier de développement & validation interne de la méthode d'analyse des toxines lipophiles par LC-MS/MS dans les mollusques bivalves " *Rapport interne Ifremer*: 99.
- Dickey, R., E. Jester, R. Granade, D. Mowdy, C. Moncreiff, D. Rebarchik, M. Robl, S. Musser et M. Poli. 1999. "Monitoring brevetoxins during a *Gymnodinium breve* red tide: Comparison of sodium channel specific cytotoxicity assay and mouse bioassay for determination of neurotoxic shellfish toxins in shellfish extracts." *Natural Toxins* 7 (4): 157-165. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1522-7189\(199907/08\)7:4<157::aid-nt52>3.0.co;2-%23](https://doi.org/10.1002/(sici)1522-7189(199907/08)7:4<157::aid-nt52>3.0.co;2-%23).
- Dickey, Robert W., Steven M. Plakas, Edward L. E. Jester, Kathleen R. El Said, Jan N. Johannessen, Leanne J. Flewelling, Paula Scott, Dan G. Hammond, Frances M. Van Dolah, Tod A. Leighfield, Marie-Yasmine Bottein Dachraoui, John S. Ramsdell, Richard H. Pierce, Mike S. Henry, Mark A. Poli, Calvin Walker, Jan Kurtz, Jerome Naar, Daniel G. Baden, Steve M. Musser, Kevin D. White, Penelope Truman, Aaron Miller, Timothy P. Hawryluk, Marleen M. Wekell, David Stirling, Michael A. Quilliam et Jung K. Lee. 2004. "Multi-Laboratory Study of

- Five Methods for the Determination of Brevetoxins in Shellfish Tissue Extracts." *Harmful algae 2002 : proceedings of the Xth International Conference on Harmful Algae, St. Pete Beach, Florida, USA, October 21-25, 2002. International Conference on Harmful Algae (10th : 2002 : St. Pete Beach, Florida)* 10: 300-302.
- Dom, I., R. Biré, V. Hort, G. Lavison-Bompard, M. Nicolas et T. Guérin. 2018. "Extended targeted and non-targeted strategies for the analysis of marine toxins in mussels and oysters by (LC-HRMS)." *Toxins* 10 (9). <https://doi.org/10.3390/toxins10090375>.
- Domènech, A., N. Cortés-Francisco, O. Palacios, J. M. Franco, P. Riobó, J. J. Llerena, S. Vichi et J. Caixach. 2014. "Determination of lipophilic marine toxins in mussels. Quantification and confirmation criteria using high resolution mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* 1328: 16-25. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.12.071>.
- Dorantes-Aranda, J. J., A. Seger, J. I. Mardones, P. D. Nichols et G. M. Hallegraeff. 2015. "Progress in understanding algal bloom-mediated fish kills: The role of superoxide radicals, phycotoxins and fatty acids." *PLoS ONE* 10 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133549>.
- Echevarria, M., J. P. Naar, C. Tomas et J. R. Pawlik. 2012. "Effects of *Karenia brevis* on clearance rates and bioaccumulation of brevetoxins in benthic suspension feeding invertebrates." *Aquatic Toxicology* 106-107: 85-94. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.10.011>.
- EFSA. 2010. "Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Emerging toxins: Brevetoxin group." *EFSA Journal* 8 (7). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1677>.
- EFSA. 2011. "Scientific Opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment." *EFSA Journal* 9 (9): 2379.
- Eissa, S., M. Siaj et M. Zourob. 2015. "Aptamer-based competitive electrochemical biosensor for brevetoxin-2." *Biosensors and Bioelectronics* 69: 148-154. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.01.055>.
- Endo, M, Y Onoue et A Kuroki. 1992. "Neurotoxin-induced cardiac disorder and its role in the death of fish exposed to *Chattonella marina*." *Marine Biology* 112 (3): 371-376.
- Engesmo, Anette, Wenche Eikrem, Sergio Seoane, Kirsty Smith, Bente Edvardsen, Antje Hofgaard et Carmelo R Tomas. 2016. "New insights into the morphology and phylogeny of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae), with the description of *Heterosigma minor* sp. nov." *Phycologia* 55 (3): 279-294.
- Errera, R. M., A. Bourdelais, M. A. Drennan, E. B. Dodd, D. W. Henrichs et L. Campbell. 2010. "Variation in brevetoxin and brevenal content among clonal cultures of *Karenia brevis* may influence bloom toxicity." *Toxicon* 55 (2-3): 195-203. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.07.013>.
- Errera, R. M. et L. Campbell. 2011. "Osmotic stress triggers toxin production by the dinoflagellate *Karenia brevis*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (26): 10597-10601. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104247108>.
- Errera, R. M., S. Yvon-Lewis, J. D. Kessler et L. Campbell. 2014. "Responses of the dinoflagellate *Karenia brevis* to climate change: PCO₂ and sea surface temperatures." *Harmful Algae* 37: 110-116. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.05.012>.
- Escobar-Morales, Sergio et David U Hernández-Becerril. 2015. "Free-living marine planktonic unarmoured dinoflagellates from the Gulf of Mexico and the Mexican Pacific." *Botanica marina* 58 (1): 9-22.
- Fang, X., Y. Tang et J. Liu. 2004. "High performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry for the determination of brevetoxin PbTx-2 in shellfish." *Chinese Journal of Chromatography (Se Pu)* 22 (1): 20-23.
- Fauquier, D. A., L. J. Flewelling, J. M. Maucher, M. Keller, M. J. Kinse, C. K. Johnson, M. Henry, J. G. Gannon, J. S. Ramsdell et J. H. Landsberg. 2013a. "Brevetoxicosis in seabirds naturally exposed to *Karenia brevis* blooms along the central west coast of Florida." *Journal of Wildlife Diseases* 49 (2): 246-260. <https://doi.org/10.7589/2011-09-270>.
- Fauquier, D. A., L. J. Flewelling, J. Maucher, C. A. Manire, V. Socha, M. J. Kinsel, B. A. Stacy, M. Henry, J. Gannon, J. S. Ramsdell et J. H. Landsberg. 2013b. "Brevetoxin in blood, biological fluids, and tissues of sea turtles naturally exposed to *Karenia brevis* blooms in central West Florida." *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 44 (2): 364-375. <https://doi.org/10.1638/2012-0164R.1>.

- Feki-Sahnoun, W., H. Njah, A. Hamza, N. Barraj, M. Mahfoudi, A. Rebai et M. B. Hassen. 2020. "Using a naive Bayes classifier to explore the factors driving the harmful dinoflagellate *Karenia selliformis* blooms in a southeastern Mediterranean lagoon." *Ocean Dynamics* 70 (7): 897-911. <https://doi.org/10.1007/s10236-020-01365-5>.
- Feki, W., A. Hamza, V. Frossard, M. Abdennadher, I. Hannachi, M. Jacquot, M. Belhassen et L. Aleya. 2013. "What are the potential drivers of blooms of the toxic dinoflagellate *Karenia selliformis*? A 10-year study in the Gulf of Gabes, Tunisia, southwestern Mediterranean Sea." *Harmful Algae* 23: 8-18. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2012.12.001>.
- Fernandez, M et Allan Cembella. 1995. "Mammalian bioassays." Dans *Manual on Harmful Marine Microalgae, IOC Manuals and Guides No. 33, UNESCO, Paris, Hallegraeff GM, DM Anderson, AD Cembella*, 213-224.
- Fire, S. E., J. A. Browning, W. N. Durden et M. K. Stolen. 2020a. "Comparison of during-bloom and inter-bloom brevetoxin and saxitoxin concentrations in Indian River Lagoon bottlenose dolphins, 2002–2011." *Aquatic Toxicology* 218. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105371>.
- Fire, S. E., L. J. Flewelling, J. Naar, M. J. Twiner, M. S. Henry, R. H. Pierce, D. P. Gannon, Z. Wang, L. Davidson et R. S. Wells. 2008a. "Prevalence of brevetoxins in prey fish of bottlenose dolphins in Sarasota Bay, Florida." *Marine Ecology Progress Series* 368: 283-294. <https://doi.org/10.3354/meps07643>.
- Fire, S. E., L. J. Flewelling, M. Stolen, W. Noke Durden, M. de Wit, A. C. Spellman et Z. Wang. 2015. "Brevetoxin-associated mass mortality event of bottlenose dolphins and manatees along the east coast of Florida, USA." *Marine Ecology Progress Series* 526: 241-251. <https://doi.org/10.3354/meps11225>.
- Fire, S. E., L. J. Flewelling, Z. Wang, J. Naar, M. S. Henry, R. H. Pierce et R. S. Wells. 2008b. "Florida red tide and brevetoxins: Association and exposure in live resident bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the eastern Gulf of Mexico, U.S.A." *Marine Mammal Science* 24 (4): 831-844. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.2008.00221.x>.
- Fire, S. E., G. A. Miller et R. S. Wells. 2020b. "Explosive exhalations by common bottlenose dolphins during *Karenia brevis* red tides." *Heliyon* 6 (3). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03525>.
- Fire, S. E., Z. Wang, M. Byrd, H. R. Whitehead, J. Paternoster et S. L. Morton. 2011. "Co-occurrence of multiple classes of harmful algal toxins in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) stranding during an unusual mortality event in Texas, USA." *Harmful Algae* 10 (3): 330-336. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2010.12.001>.
- Fire, Spencer E., Deborah Fauquier, Leanne J. Flewelling, Michael Henry, Jerome Naar, Richard Pierce et Randall S. Wells. 2007. "Brevetoxin exposure in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) associated with *Karenia brevis* blooms in Sarasota Bay, Florida." *Marine Biology* 152 (4): 827-834. <https://doi.org/10.1007/s00227-007-0733-x>.
- Fleming, L. E., L. C. Backer et D. G. Baden. 2005a. "Overview of aerosolized Florida red tide toxins: Exposures and effects." *Environmental Health Perspectives* 113 (5): 618-620. <https://doi.org/10.1289/ehp.7501>.
- Fleming, L. E., B. Kirkpatrick, L. C. Backer, J. A. Bean, A. Wanner, D. Dalpra, R. Tamer, J. Zaias, Y. S. Cheng, R. Pierce, J. Naar, W. Abraham, R. Clark, Y. Zhou, M. S. Henry, D. Johnson, G. Van De Bogart, G. D. Bossart, M. Harrington et D. G. Baden. 2005b. "Initial evaluation of the effects of aerosolized Florida red tide toxins (brevetoxins) in persons with asthma." *Environmental Health Perspectives* 113 (5): 650-657. <https://doi.org/10.1289/ehp.7500>.
- Flewelling, L. J., D. H. Adams, J. P. Naar, K. E. Atwood, A. A. Granholm, S. N. O'Dea et J. H. Landsberg. 2010. "Brevetoxins in sharks and rays (Chondrichthyes, Elasmobranchii) from Florida coastal waters." *Marine Biology* 157 (9): 1937-1953. <https://doi.org/10.1007/s00227-010-1463-z>.
- Flewelling, L. J., A. A. Corcoran, A. A. Granholm, N. Y. Takeuchi, R. V. Van Hoeck et M. L. Zahara. 2020. "Validation and Assessment of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Elisa) for Use in Monitoring and Managing Neurotoxic Shellfish Poisoning." *Journal of Shellfish Research* 39 (2): 491-500. <https://doi.org/10.2983/035.039.0230>.
- Flewelling, L. J., J. P. Naar, J. P. Abbott, D. G. Baden, N. B. Barros, G. D. Bossart, M. Y. Bottein, D. G. Hammond, E. M. Haubold, C. A. Heil, M. S. Henry, H. M. Jacocks, T. A. Leighfield, R. H.

- Pierce, T. D. Pitchford, S. A. Rommel, P. S. Scott, K. A. Steidinger, E. W. Truby, F. M. Van Dolah et J. H. Landsberg. 2005. "Brevetoxicosis: red tides and marine mammal mortalities." *Nature* 435 (7043): 755-6. <https://doi.org/10.1038/nature435755a>.
- Flewelling, Leanne J. 2008. "Vectors of brevetoxins to marine mammals."
- Foley, A. M., B. A. Stacy, P. Schueller, L. J. Flewelling, B. Schroeder, K. Minch, D. A. Fauquier, J. J. Foote, C. A. Manire, K. E. Atwood, A. A. Granholm et J. H. Landsberg. 2019. "Assessing *Karenia brevis* red tide as a mortality factor of sea turtles in Florida, USA." *Diseases of Aquatic Organisms* 132 (2): 109-124. <https://doi.org/10.3354/dao03308>.
- Food and Drug Administration (FDA). 2017. "National Shellfish Sanitation Program (NSSP) Guide for the Control of Molluscan Shellfish (2017 Revision)."
- Food and Drug Administration (FDA). 2019. "National Shellfish Sanitation Program (NSSP) Guide for the Control of Molluscan Shellfish (2019 Revision)."
- Forrester, Donald J, Jack M Gaskin, Franklin H White, Neal P Thompson, Joe A Quick jr, George E Henderson, James C Woodard et W David Robertson. 1977. "An epizootic of waterfowl associated with a red tide episode in Florida." *Journal of wildlife diseases* 13 (2): 160-167.
- Fowler, N., C. Tomas, D. Baden, L. Campbell et A. Bourdelais. 2015. "Chemical analysis of *Karenia papilionacea*." *Toxicon* 101: 85-91. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.05.007>.
- Fu, Meng, Albert Koulman, Marion van Rijssel, Arne Lützen, M Karin de Boer, Monika R Tyl et Gerd Liebezeit. 2004. "Chemical characterisation of three haemolytic compounds from the microalgal species *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae)." *Toxicon* 43 (4): 355-363.
- Fukuyo, Yasuwo, Hideaki Takano, Mitsuo Chihara et Kazumi Matsuoka. 1990. *Red tide organisms in Japan: an illustrated taxonomic guide*. Uchida Rokakuho Tokyo.
- Fuwa, Haruhiko, Makoto Ebine, Andrea J Bourdelais, Daniel G Baden et Makoto Sasaki. 2006. "Total synthesis, structure revision, and absolute configuration of (-)-brevenal." *Journal of the American Chemical Society* 128 (51): 16989-16999.
- Gallagher, Joel P et Patricia Shinnick-Gallagher. 1980. "Effect of *Gymnodinium breve* toxin in the rat phrenic nerve diaphragm preparation." *British journal of pharmacology* 69 (3): 367.
- Gallardo-Rodríguez, J. J., A. Astuya-Villalón, V. Avello, A. Llanos-Rivera, B. Krock, C. Agurto-Muñoz, A. Sánchez-Mirón et F. García-Camacho. 2020. "Production of extracts with anaesthetic activity from the culture of *Heterosigma akashiwo* in pilot-scale photobioreactors." *Algal Research* 45. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101760>.
- Garthwaite, Ian, Kathryn M Ross, Christopher O Miles, Lyn R Briggs, Neale R Towers, Teresa Borrell et Phil Busby. 2001. "Integrated enzyme-linked immunosorbent assay screening system for amnesic, neurotoxic, diarrhetic, and paralytic shellfish poisoning toxins found in New Zealand." *Journal of AOAC International* 84 (5): 1643-1648.
- Gaydos, J. K. 2006. *Bottlenose Dolphins and Brevetoxins: A Coordinated Research and Response Plan*. NOAA Technical Memorandum NMFS-OPR-32.
- Geraci, J. R. 1989. "Clinical investigation of the 1987-88 mass mortality of bottlenose dolphins along the U.S. central and south Atlantic coast : final report to National Marine Fisheries Service and U.S. Navy Office of Naval Research and Marine Mammal Commission."
- Gerssen, A. 2020. "Netherlands monitoring program of brevetoxins ", 2020 septembre 18.
- Gessner, Bradford D. 2000. "Neurotoxic toxins." Dans *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection*, édité par Marcel Dekker, 65-90. : LM Botana.
- Goldin, Alan L. 2001. "Resurgence of sodium channel research." *Annual review of physiology* 63 (1): 871-894.
- Golik, J., J. C. James, K. Nakanishi et Y. Y. Lin. 1982. "The structure of brevetoxin C." *Tetrahedron Letters* 23 (25): 2535-2538. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)87389-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)87389-X).
- Gonzalez-Romero, R., V. Suarez-Ulloa, J. Rodriguez-Casariago, D. Garcia-Souto, G. Diaz, A. Smith, J. J. Pasantes, G. Rand et J. M. Eirin-Lopez. 2017. "Effects of Florida Red Tides on histone variant expression and DNA methylation in the Eastern oyster *Crassostrea virginica*." *Aquatic Toxicology* 186: 196-204. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.03.006>.
- Gordon, C. J., K. L. Kimm-Brinson, B. Padnos et J. S. Ramsdell. 2001. "Acute and delayed thermoregulatory response of mice exposed to brevetoxin." *Toxicon* 39 (9): 1367-1374. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00092-7](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00092-7).

- Gravinese, P. M., E. Saso, V. J. Lovko, P. Blum, C. Cole et R. H. Pierce. 2019. "Karenia brevis causes high mortality and impaired swimming behavior of Florida stone crab larvae." *Harmful Algae* 84: 188-194. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.04.007>.
- Griffith, A. W., S. E. Shumway et A. K. Voley. 2013. "Bioaccumulation and depuration of brevetoxins in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) and the northern quahog (= hard clam, *Mercenaria mercenaria*)." *Toxicon* 66: 75-81. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.01.016>.
- Guillou, Laure, Elisabeth Nézan, Valérie Cueff, Evelyne Erard-Le Denn, Marie-Anne Cambon-Bonavita, Patrick Gentien et Georges Barbier. 2002. "Genetic diversity and molecular detection of three toxic dinoflagellate genera (*Alexandrium*, *Dinophysis*, and *Karenia*) from French coasts." *Protist* 153 (3): 223-238.
- Gunter, Gordon, Robert H Williams, Charles C Davis et FG Walton Smith. 1948. "Catastrophic mass mortality of marine animals and coincident phytoplankton bloom on the west coast of Florida, November 1946 to August 1947." *Ecological Monographs* 18 (3): 309-324.
- Hamamoto, Yuka, Kazuo Tachibana, Patrick T Holland, Feng Shi, Veronica Beuzenberg, Yoshiyuki Itoh et Masayuki Satake. 2012. "Brevisulcinal-F: A polycyclic ether toxin associated with massive fish-kills in New Zealand." *Journal of the American Chemical Society* 134 (10): 4963-4968.
- Haque, S. M. et Y. Onoue. 2002. "Variation in toxin compositions of two harmful raphidophytes, *Chattonella antiqua* and *Chattonella marina*, at different salinities." *Environmental Toxicology* 17 (2): 113-118. <https://doi.org/10.1002/tox.10039>.
- Hardison, D. R., W. C. Holland, R. D. Currier, B. Kirkpatrick, R. Stumpf, T. Fanara, D. Burris, A. Reich, G. J. Kirkpatrick et R. W. Litaker. 2019. "HABscope: A tool for use by citizen scientists to facilitate early warning of respiratory irritation caused by toxic blooms of *Karenia brevis*." *PLoS One* 14 (6): e0218489. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218489>.
- Hardison, D. R., W. G. Sunda, D. Shea et R. W. Litaker. 2013. "Increased Toxicity of *Karenia brevis* during Phosphate Limited Growth: Ecological and Evolutionary Implications." *PLoS ONE* 8 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058545>.
- Hartmann, Andreas, Martin Schumacher, Ulla Plappert-Helbig, Phil Lowe, Willi Suter et Lutz Mueller. 2004. "Use of the alkaline in vivo Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations." *Mutagenesis* 19 (1): 51-59.
- Harvey, Elizabeth L et Susanne Menden-Deuer. 2011. "Avoidance, movement, and mortality: the interactions between a protistan grazer and *Heterosigma akashiwo*, a harmful algal bloom species." *Limnology and oceanography* 56 (1): 371-378.
- Harwood, D Tim, Feng Shi, Masayuki Satake et Patrick T Holland. 2014. "A sensitive LC-MS/MS assay for brevisulcinal and brevisulcatic acid toxins produced by the dinoflagellate *Karenia brevisulcata*." *Toxicon* 84: 19-27.
- Haywood, A. J., K. A. Steidinger, E. W. Truby, P. R. Bergquist, P. L. Bergquist, J. Adamson et L. MacKenzie. 2004. "Comparative morphology and molecular phylogenetic analysis of three new species of the genus *Karenia* (Dinophyceae) from New Zealand." *Journal of Phycology* 40 (1): 165-179. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.2004.02-149.x>.
- Haywood, Allison J., Christopher A. Scholin, Roman Marin III, Karen A. Steidinger, Cynthia Heil et Jason Ray. 2007. "Molecular detection of the brevetoxin-producing dinoflagellate *Karenia brevis* and closely related species using rRNA-targeted probes and a semiautomated sandwich hybridization assay1." *Journal of Phycology* 43 (6): 1271-1286. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2007.00407.x>.
- Heil, D. C. 2009. "*Karenia brevis* monitoring, management, and mitigation for Florida molluscan shellfish harvesting areas." *Harmful Algae* 8 (4): 608-610. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.11.007>.
- Hemmert, Wynn H. 1975. "The public health implications of *Gymnodinium breve* red tides, a review of the literature and recent events." Proceedings of the First International Conference on Toxic Dinoflagellate B. 532.
- Herndon, Julian et William P Cochlan. 2007. "Nitrogen utilization by the raphidophyte *Heterosigma akashiwo*: growth and uptake kinetics in laboratory cultures." *Harmful Algae* 6 (2): 260-270.

- Hiroishi, Shingo, Hideaki Okada, Ichiro Imai et Takashi Yoshida. 2005. "High toxicity of the novel bloom-forming species *Chattonella ovata* (Raphidophyceae) to cultured fish." *Harmful algae* 4 (4): 783-787.
- Hitchcock, G. L., J. W. Fourqurean, J. L. Drake, R. N. Mead et C. A. Heil. 2012. "Brevetoxin persistence in sediments and seagrass epiphytes of east Florida coastal waters." *Harmful Algae* 13: 89-94. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.008>.
- Hiyama, Takeshi Y, Eiji Watanabe, Kentaro Ono, Kiyotoshi Inenaga, Michael M Tamkun, Shigeru Yoshida et Masaharu Noda. 2002. "Na x channel involved in CNS sodium-level sensing." *Nature neuroscience* 5 (6): 511-512.
- Hoagland, P., Jin, D., Polansky, L. Y., Kirkpatrick, B., Kirkpatrick, G., Fleming, L. E., Reich, A., Watkins, S. M., Ullmann, S. G., & Backer, L. C. (2009). The costs of respiratory illnesses arising from Florida gulf coast *Karenia brevis* blooms. *Environmental health perspectives*, 117(8), 1239–1243. <https://doi.org/10.1289/ehp.0900645>
- Hoe Chang, F. 1999. "Gymnodinium brevisulcatum sp. nov.(Gymnodiniales, Dinophyceae), a new species isolated from the 1998 summer toxic bloom in Wellington Harbour, New Zealand." *Phycologia* 38 (5): 377-384.
- Holland, P. T., F. Shi, M. Satake, Y. Hamamoto, E. Ito, V. Beuzenberg, P. McNabb, R. Munday, L. Briggs, P. Truman, R. Gooneratne, P. Edwards et S. M. Pascal. 2012. "Novel toxins produced by the dinoflagellate *Karenia brevisulcata*." *Harmful Algae* 13: 47-57. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.002>.
- Hong, J., S. Talapatra, J. Katz, P. A. Tester, R. J. Waggett et A. R. Place. 2012. "Algal toxins alter copepod feeding behavior." *PLoS ONE* 7 (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036845>.
- Honjo, T., M. Yamaguchi et O. Nakamura. 1991. "A Relationship between Winter Water Temperature and the Timing of Summer *Gymnodinium nagasakiense* Red Tides in Gokasho Bay." *Nippon Suisan Gakkaishi (Japanese Edition)* 57 (9): 1679-1682. <https://doi.org/10.2331/suisan.57.1679>.
- Hopkins R., S. Heber, R. Hammond. 1997. "Water-released disease in Florida : continuing threats require vigilance. *Journal of Florida medical association*, 84 (7) : 441.
- Hua, Y. et R. B. Cole. 1999. "Solution reactivity of brevetoxins as monitored by electrospray ionization mass spectrometry and implications for detoxification." *Chemical Research in Toxicology* 12 (12): 1268-1277. <https://doi.org/10.1021/tx9900876>.
- Hua, Y. et R. B. Cole. 2000. "Electrospray ionization tandem mass spectrometry for structural elucidation of protonated brevetoxins in red tide algae." *Analytical Chemistry* 72 (2): 376-383. <https://doi.org/10.1021/ac990433o>.
- Hua, Y., W. Lu, R. B. Cole, M. S. Henry et R. H. Pierce. 1995. "On-Line High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry for the Determination of Brevetoxins in "Red Tide" Algae." *Analytical Chemistry* 67 (11): 1815-1823. <https://doi.org/10.1021/ac00107a010>.
- Hua, Y., W. Lu, M. S. Henry, R. H. Pierce et R. B. Cole. 1996. "On-line liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for determination of the brevetoxin profile in natural 'red tide' algae blooms." *Journal of Chromatography A* 750 (1-2): 115-125. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(96\)00470-0](https://doi.org/10.1016/0021-9673(96)00470-0).
- Huang, J. M. C., C. H. Wu et D. G. Baden. 1984. "Depolarizing action of a red-tide dinoflagellate brevetoxin on axonal membranes." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 229 (2): 615-621.
- Hummert, C., A. Rühl, K. Reinhardt, G. Gerds et B. Luckas. 2002. "Simultaneous analysis of different algal toxins by LC-MS." *Chromatographia* 55 (11-12): 673-680. <https://doi.org/10.1007/BF02491781>.
- Igarashi, T., S. Aritake et T. Yasumoto. 1998. "Biological activities of prymnesin-2 isolated from a red tide alga *Prymnesium parvum*." *Natural Toxins* 6 (1): 35-41. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-7189\(199802\)6:1<35::AID-NT7>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-7189(199802)6:1<35::AID-NT7>3.0.CO;2-7).
- Imai, I. 1989. "Cyst formation of the noxious red tide flagellate *Chattonella marina* (Raphidophyceae) in culture." *Marine Biology* 103 (2): 235-239.
- Imai, I et K Itoh. 1987. "Annual life cycle of *Chattonella* spp., causative flagellates of noxious red tides in the Inland Sea of Japan." *Marine Biology* 94 (2): 287-292.

- Imai, Ichiro et Mineo Yamaguchi. 2012. "Life cycle, physiology, ecology and red tide occurrences of the fish-killing raphidophyte *Chattonella*." *Harmful algae* 14: 46-70.
- Irie, R., R. Suzuki, K. Tachibana, P. T. Holland, D. T. Harwood, F. Shi, P. McNabb, V. Beuzenberg, F. Hayashi, H. Zhang et M. Satake. 2016. "Brevisulcatic acids from a marine microalgal species implicated in a toxic event in New Zealand." *Heterocycles* 92 (1): 45-54. <https://doi.org/10.3987/COM-15-13332>.
- Ishida, H., N. Muramatsu, H. Nukaya, T. Kosuge et K. Tsuji. 1996. "Study on neurotoxic shellfish poisoning involving the oyster, *Crassostrea gigas*, in New Zealand." *Toxicon* 34 (9): 1050-1053. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(96\)00076-1](https://doi.org/10.1016/0041-0101(96)00076-1).
- Ishida, H., A. Nozawa, H. Hamano, H. Naoki, T. Fujita, H. F. Kaspar et K. Tsuji. 2004a. "Brevetoxin B5, a new brevetoxin analog isolated from cockle *Austrovenus stutchburyi* in New Zealand, the marker for monitoring shellfish neurotoxicity." *Tetrahedron Letters* 45 (1): 29-33. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2003.10.124>.
- Ishida, H., A. Nozawa, H. Nukaya, L. Rhodes, P. McNabb, P. T. Holland et K. Tsuji. 2004b. "Confirmation of brevetoxin metabolism in cockle, *Austrovenus stutchburyi*, and greenshell mussel, *Perna canaliculus*, associated with New Zealand neurotoxic shellfish poisoning, by controlled exposure to *Karenia brevis* culture." *Toxicon* 43 (6): 701-712. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.03.002>.
- Ishida, H., A. Nozawa, H. Nukaya et K. Tsuji. 2004c. "Comparative concentrations of brevetoxins PbTx-2, PbTx-3, BTX-B1 and BTX-B5 in cockle, *Austrovenus stutchburyi*, greenshell mussel, *Perna canaliculus*, and Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, involved neurotoxic shellfish poisoning in New Zealand." *Toxicon* 43 (7): 779-789. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.03.007>.
- Iwasaki, H. et K. Sasada. 1969. "Studies on the Red Tide Dinoflagellates-1. On *Entomosigma* sp. Appeared in Gokasho Bay, Shima Peninsula." *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 35: 943-947.
- Jeglitsch, G., K. Rein, D. G. Baden et D. J. Adams. 1998. "Brevetoxin-3 (PbTx-3) and its derivatives modulate single tetrodotoxin-sensitive sodium channels in rat sensory neurons." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 284 (2): 516-525.
- Johnson, G. L., J. J. Spikes et S. Ellis. 1985. "Cardiovascular effects of brevetoxins in dogs." *Toxicon* 23 (3): 505-515. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(85\)90035-2](https://doi.org/10.1016/0041-0101(85)90035-2).
- Kai, AKL, YK Cheung, PKK Yeung et JTY Wong. 2006. "Development of single-cell PCR methods for the Raphidophyceae." *Harmful Algae* 5 (6): 649-657.
- Kang, Y. 2010. "The Distribution of Dinoflagellate Cysts along the West Florida Coast (WFC)." *Thesis, University of Miami*.
- Keppler, C. J., A. J. Lewitus, A. H. Ringwood, J. Hogue et T. Staton. 2006. "Sublethal cellular effects of short-term raphidophyte and brevetoxin exposures on the eastern oyster *Crassostrea virginica*." *Marine Ecology Progress Series* 312: 141-147. <https://doi.org/10.3354/meps312141>.
- Keppler, Charles J, Jennifer Hogue, Kristin Smith, Amy H Ringwood et Alan J Lewitus. 2005. "Sublethal effects of the toxic alga *Heterosigma akashiwo* on the southeastern oyster (*Crassostrea virginica*)." *Harmful Algae* 4 (2): 275-285.
- Khan, S., O. Arakawa et Y. Onoue. 1996a. "Neurotoxin production by a chloromonad *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae)." *Journal of the World Aquaculture Society* 27 (3): 254-263. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1996.tb00607.x>.
- Khan, S., O. Arakawa et Y. Onoue. 1996b. "A toxicological study of the marine phytoflagellate, *Chattonella antiqua* (Raphidophyceae)." *Phycologia* 35 (3): 239-244. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-35-3-239.1>.
- Khan, S., O. Arakawa et Y. Onoue. 1997. "Neurotoxins in a toxic red tide of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) in Kagoshima Bay, Japan." *Aquaculture Research* 28 (1): 9-14. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.1997.tb01309.x>.
- Kim, Joo-Hwan, Bum Soo Park, Pengbin Wang, Jin Ho Kim, Seok Hyun Youn et Myung-Soo Han. 2015. "Cyst morphology and germination in *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae)." *Phycologia* 54 (5): 435-439.

- Kimm-Brinson, K. L. et J. S. Ramsdell. 2001. "The red tide toxin, brevetoxin, induces embryo toxicity and developmental abnormalities." *Environmental Health Perspectives* 109 (4): 377-381. <https://doi.org/10.1289/ehp.01109377>.
- Kirkpatrick, B., R. Currier, K. Nierenberg, A. Reich, L. C. Backer, R. Stumpf, L. Fleming et G. Kirkpatrick. 2008. "Florida red tide and human health: A pilot beach conditions reporting system to minimize human exposure." *Science of the Total Environment* 402 (1): 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.03.032>.
- Koizumi, Yoshitsugu, Takuji Uchida et Tsuneo Honjo. 1996. "Diurnal vertical migration of *Gymnodinium mikimotoi* during a red tide in Hoketsu Bay, Japan." *Journal of plankton research* 18 (2): 289-294.
- Konoki, K., D. G. Baden, T. Scheuer et W. A. Catterall. 2019. "Molecular determinants of brevetoxin binding to voltage-gated sodium channels." *Toxins* 11 (9). <https://doi.org/10.3390/toxins11090513>.
- Kreuder, C., J. A. K. Mazet, G. D. Bossart, T. E. Carpenter, M. Holyoak, M. S. Elie et S. D. Wright. 2002. "Clinicopathologic features of suspected brevetoxicosis in double-crested cormorants (*Phalacrocorax auritus*) along the Florida Gulf Coast." *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 33 (1): 8-15. [https://doi.org/10.1638/1042-7260\(2002\)033\[0008:CFOSBI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1638/1042-7260(2002)033[0008:CFOSBI]2.0.CO;2).
- Kulagina, N. V., C. M. Mikulski, S. Gray, W. Ma, G. J. Doucette, J. S. Ramsdell et J. J. Pancrazio. 2006. "Detection of marine toxins, brevetoxin-3 and saxitoxin, in seawater using neuronal networks." *Environmental Science and Technology* 40 (2): 578-583. <https://doi.org/10.1021/es051272a>.
- Kusek, Kristen M, Gabriel Vargo et K Steidinger. 1999. "Gymnodinium breve in the field, in the lab, and in the newspaper- a scientific and journalistic analysis of Florida red tides." *Contributions in marine science* 34: 1-228.
- Landsberg, Jan H. 2002. "The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms." *Reviews in Fisheries Science* 10 (2): 113-390.
- Landsberg, JH, LJ Flewelling et J Naar. 2009. "Karenia brevis red tides, brevetoxins in the food web, and impacts on natural resources: Decadal advancements." *Harmful Algae* 8 (4): 598-607.
- Lassus, Patrick, Nicolas Chomérat, Philipp Hess et Elisabeth Nézan. 2016. *Toxic and harmful microalgae of the World Ocean*. UNESCO.
- Lawrence, Jim, Henry Loreal, Hajime Toyofuku, Philipp Hess, Karunasagar Iddya et Lahsen Ababouch. 2011. "Assessment and management of biotoxin risks in bivalve molluscs." *FAO fisheries and aquaculture technical paper* (551): I.
- Lee, Jungmee, Hong-Se Oh et Han-Young Kang. 2015. "A formal total synthesis of (-)-brevisamide, a marine monocyclic ether amide." *Tetrahedron Letters* 56 (9): 1099-1102.
- Leighfield, T. A., N. Muha et J. S. Ramsdell. 2009. "Brevetoxin B is a clastogen in rats, but lacks mutagenic potential in the SP-98/100 Ames test." *Toxicol* 54 (6): 851-856. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2009.06.018>.
- Lekan, D. K. et C. R. Tomas. 2010. "The brevetoxin and brevenal composition of three *Karenia brevis* clones at different salinities and nutrient conditions." *Harmful Algae* 9 (1): 39-47. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2009.07.004>.
- Lerdo de Tejada, Miguel. 1857. "Apuntes históricos de la heroica ciudad de Veracruz: precedidos de una noticia de los descubrimientos hechos en las islas y en el Continente Americano, y de las providencias dictadas por los reyes de España para el gobierno de sus nuevas posesiones, desde el primer viaje de don Cristóbal Colón, hasta que se emprendió la conquista de México. Tomo I."
- Lester, Kristen M., Cynthia A. Heil, Merry B. Neely, Danylle N. Spence, Susan Murasko, Thomas L. Hopkins, Tracey T. Sutton, Scott E. Burghart, Richard N. Bohrer, Andrew W. Remsen, Gabriel A. Vargo et John J. Walsh. 2008. "Zooplankton and *Karenia brevis* in the Gulf of Mexico." *Continental Shelf Research* 28 (1): 99-111. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.csr.2007.04.009>.
- Leverone, J. R., N. J. Blake, R. H. Pierce et S. E. Shumway. 2006. "Effects of the dinoflagellate *Karenia brevis* on larval development in three species of bivalve mollusc from Florida." *Toxicol* 48 (1): 75-84. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2006.04.012>.

- Lewis, R. J., A. Jones et J. P. Vernoux. 1999. "HPLC/tandem electrospray mass spectrometry for the determination of Sub-ppb levels of pacific and caribbean ciguatoxins in crude extracts of fish." *Analytical Chemistry* 71 (1): 247-250. <https://doi.org/10.1021/ac980598h>.
- Li, Siu-Chung, Wen-Xiong Wang et Dennis PH Hsieh. 2002. "Effects of toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* on the energy budgets and growth of two marine bivalves." *Marine environmental research* 53 (2): 145-160.
- Li, X., T. Yan, R. Yu et M. Zhou. 2019. "A review of *karenia mikimotoi*: Bloom events, physiology, toxicity and toxic mechanism." *Harmful Algae* 90: 101702. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101702>.
- Liberona, J. L., J. C. Cardenas, R. Reyes, J. Hidalgo, J. Molgo et E. Jaimovich. 2008. "Sodium-dependent action potentials induced by brevetoxin-3 trigger both IP3 increase and intracellular Ca²⁺ release in rat skeletal myotubes." *Cell Calcium* 44 (3): 289-97. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2007.12.009>.
- Lin, Y. Y., M. Risk, S. M. Ray, D. Van Engen, J. Clardy, J. Golik, J. C. James et K. Nakanishi. 1981. "Isolation and Structure of Brevetoxin B from the "Red Tide" Dinoflagellate *Ptychodiscus brevis* (*Gymnodinium breve*)." *Journal of the American Chemical Society* 103 (22): 6773-6775. <https://doi.org/10.1021/ja00412a053>.
- Lombet, A., J. N. Bidard et M. Lazdunski. 1987. "Ciguatoxin and brevetoxins share a common receptor site on the neuronal voltage-dependent Na⁺ channel." *FEBS Letters* 219 (2): 355-359. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)80252-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)80252-1).
- López Cogolludo, D. 1688. *Historia de Yucatán*. Edité par 5 édition° : 1996. Campeche: H. Ayuntamiento de Campeche.
- Lu, Z. et S. M. Tomchik. 2002. "Effects of a red-tide toxin on fish hearing." *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 188 (10): 807-813. <https://doi.org/10.1007/s00359-002-0369-8>.
- Maciel-Baltazar, Ebodio et David U Hernández-Becerril. 2013. "Especies de dinoflagelados atecados (Dinophyta) de la costa de Chiapas, sur del Pacifico mexicano." *Revista de biología marina y oceanografía* 48 (2): 245-259.
- MacKenzie, L., L Rhodes, D Till, F Hoe Chang, H Kaspar, A Haywood, J Kapa et B Walker. 1995. "A *Gymnodinium* sp. bloom and the contamination of shellfish with lipid soluble toxins in New Zealand, Jan–April 1993." *Harmful marine algal blooms*: 795-800.
- Magaña, Hugo A, Cindy Contreras et Tracy A Villareal. 2003. "A historical assessment of *Karenia brevis* in the western Gulf of Mexico." *Harmful Algae* 2 (3): 163-171.
- Mahoney, John B, Paul Olsen et Myra Cohn. 1990. "Blooms of a dinoflagellate *Gyrodinium* cf. *aureolum* in New Jersey coastal waters and their occurrence and effects worldwide." *Journal of Coastal Research*: 121-135.
- Manger, R. L., L. S. Leja, S. Y. Lee, J. M. Hungerford, Y. Hokama, R. W. Dickey, H. R. Granade, R. Lewis, T. Yasumoto et M. M. Wekell. 1995. "Detection of sodium channel toxins: directed cytotoxicity assays of purified ciguatoxins, brevetoxins, saxitoxins, and seafood extracts." *Journal of AOAC International* 78 (2): 521-527.
- Manger, R. L., L. S. Leja, S. Y. Lee, J. M. Hungerford et M. M. Wekell. 1993. "Tetrazolium-based cell bioassay for neurotoxins active on voltage-sensitive sodium channels: semiautomated assay for saxitoxins, brevetoxins, and ciguatoxins." *Anal Biochem* 214 (1): 190-4. <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1476>.
- Manger, RL, LS Leja, SY Lee, JM Hungerford et MM Wekell. 1994. "Cell bioassay for the detection of ciguatoxins, brevetoxins, and saxitoxins." *Memoirs of the Queensland Museum. Brisbane* 34 (3): 571-575.
- Manire, C. A., E. T. Anderson, L. Byrd et D. A. Fauquier. 2013. "Dehydration as an effective treatment for brevetoxicosis in loggerhead sea turtles (*Caretta Caretta*)." *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 44 (2): 447-452. <https://doi.org/10.1638/2012-0163R.1>.
- Marshall, J. A., P. D. Nichols, B. Hamilton, R. J. Lewis et G. M. Hallegraef. 2003. "Ichthyotoxicity of *Chattonella marina* (Raphidophyceae) to damselfish (*Acanthochromis polycaanthus*): The synergistic role of reactive oxygen species and free fatty acids." *Harmful Algae* 2 (4): 273-281. [https://doi.org/10.1016/S1568-9883\(03\)00046-5](https://doi.org/10.1016/S1568-9883(03)00046-5).

- Marshall, Judith-Anne, Peter D Nichols et Gustaaf M Hallegraef. 2002. "Chemotaxonomic survey of sterols and fatty acids in six marine raphidophyte algae." *Journal of Applied Phycology* 14 (4): 255-265.
- Mattei, C., M. Y. Dechraoui, J. Molgó, F. A. Meunier, A. M. Legrand et E. Benoit. 1999. "Neurotoxins targeting receptor site 5 of voltage-dependent sodium channels increase the nodal volume of myelinated axons." *Journal of Neuroscience Research* 55 (6): 666-673. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19990315\)55:6<666::AID-JNR2>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19990315)55:6<666::AID-JNR2>3.0.CO;2-H).
- Mattei C., Legros C. 2014. The voltage-gated sodium channel: a major target of marine neurotoxins. *Toxicon* 91: 84-95. [doi: 10.1016/j.toxicon.2014.09.016](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.09.016).
- Maucher, J. M., L. Briggs, C. Podmore et J. S. Ramsdell. 2007. "Optimization of blood collection card method/enzyme-linked immunoassay for monitoring exposure of bottlenose dolphin to brevetoxin-producing red tides." *Environmental Science and Technology* 41 (2): 563-567. <https://doi.org/10.1021/es0612605>.
- McCall, J. R., A. J. Goodman, H. M. Jacocks, A. M. Thompson, D. G. Baden et A. J. Bourdelais. 2014. "Development of a fluorescence assay for the characterization of brevenal binding to rat brain synaptosomes." *Journal of Natural Products* 77 (9): 2014-2020. <https://doi.org/10.1021/np500118p>.
- McCall, J. R., H. M. Jacocks, D. G. Baden et A. J. Bourdelais. 2012. "Development of a competitive fluorescence-based synaptosome binding assay for brevetoxins." *Harmful Algae* 19: 85-91. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2012.06.003>.
- McFarland, K., F. Jean, P. Soudant et A. K. Volety. 2015. "Uptake and elimination of brevetoxin in the invasive green mussel, *Perna viridis*, during natural *Karenia brevis* blooms in southwest Florida." *Toxicon* 97: 46-52. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.02.005>.
- McFarland, K., F. Jean, J. Thébault et A. K. Volety. 2016. "Potential impacts of blooms of the toxic dinoflagellate *Karenia brevis* on the growth, survival and juvenile recruitment of the non-native green mussel *Perna viridis* in southeastern United States." *Toxicon* 109: 94-102. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.11.017>.
- McFarren, EF et AF Bartsch. 1960. "Application of the paralytic shellfish poison assay to poisonous fishes." *Journal of Association of Official Agricultural Chemists* 43 (3): 548-554.
- McFarren, EF, H Tanabe, FJ Silva, We Be Wilson, JE Campbell et KH Lewis. 1965. "The occurrence of a ciguatera-like poison in oysters, clams, and *Gymnodinium breve* cultures." *Toxicon* 3 (2): 111-123.
- McNabb, P. S., A. I. Selwood, R. Van Ginkel, M. Boundy et P. T. Holland. 2012. "Determination of brevetoxins in shellfish by LC/MS/MS: Single-laboratory validation." *Journal of AOAC International* 95 (4): 1097-1105. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.11-272>.
- Mead, R. N., E. E. Probst, J. R. Helms, G. B. Avery, R. J. Kieber et S. A. Skrabal. 2014. "Enhanced detection of the algal toxin PbTx-2 in marine waters by atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry." *Rapid Commun Mass Spectrom* 28 (22): 2455-60. <https://doi.org/10.1002/rcm.7032>.
- Medhioub, A., W. Medhioub, Z. Amzil, M. Sibat, M. Bardouil, I. Ben Neila, S. Mezghani, A. Hamza et P. Lassus. 2009. "Influence of environmental parameters on *Karenia selliformis* toxin content in culture." *Cahiers De Biologie Marine* 50 (4): 333-342.
- Medhioub, Walid, Marielle Gueguen, Patrick Lassus, Michele Bardouil, Philippe Truquet, Manoella Sibat, Medhioub Nejib, Soudant Philippe, Kraiem Mejdeddine et Zouher Amzil. 2010. "Detoxification enhancement in the gymnodimine-contaminated grooved carpet shell, *Ruditapes decussatus* (Linne)." *Harmful Algae* 9 (2): 200-207. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2009.10.002>.
- Mendoza, W. G., R. N. Mead, L. E. Brand et D. Shea. 2008. "Determination of brevetoxin in recent marine sediments." *Chemosphere* 73 (8): 1373-1377. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07.089>.
- Meunier, F. A., C. Colasante et J. Molgo. 1997. "Sodium-dependent increase in quantal secretion induced by brevetoxin-3 in Ca²⁺-free medium is associated with depletion of synaptic vesicles and swelling of motor nerve terminals in situ." *Neuroscience* 78 (3): 883-893. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(96\)00568-4](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(96)00568-4).

- Mignot, JP. 1976. "COMPLEMENTS A L'ETUDE DES CHLOROMONADINES: ULTRASTRUCTURE DE CHATTONELLA SUBSALA BIECHELER, FLAGELLE D'EAU SAUMATRE."
- Milandri, Anna. 2020. "Danemark monitoring program of brevetoxins." 12 octobre 2020.
- Miles, Christopher O, Alistair L Wilkins, David J Stirling et A Lincoln MacKenzie. 2000. "New analogue of gymnodimine from a Gymnodinium species." *Journal of agricultural and food chemistry* 48 (4): 1373-1376.
- Miles, Christopher O, Alistair L Wilkins, David J Stirling et A Lincoln MacKenzie. 2003. "Gymnodimine C, an isomer of gymnodimine B, from *Karenia selliformis*." *Journal of agricultural and food chemistry* 51 (16): 4838-4840.
- Moestrup, Ø., R. Akselman, G. Cronberg, Elbraechter, Fraga M., S., , Y. Halim, G. Hansen, M. Hoppenrath, J. Larsen, Lundholm, Nguyen N., L. N., et A. Zingone. 2009. IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae.
- Mooney, Ben D, Peter D Nichols, Miguel F De Salas et Gustaaf M Hallegraeff. 2007. "Lipid, fatty acid, and sterol composition of eight species of Kareniaceae (Dinophyta): Chemotaxonomy and putative lipid phycotoxins." *Journal of Phycology* 43 (1): 101-111.
- Morohashi, A., M. Satake, K. Murata, H. Naoki, H. F. Kaspar et T. Yasumoto. 1995. "Brevetoxin B3, a new brevetoxin analog isolated from the greenshell mussel *Perna canaliculus* involved in neurotoxic shellfish poisoning in new zealand." *Tetrahedron Letters* 36 (49): 8995-8998. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(95\)01969-0](https://doi.org/10.1016/0040-4039(95)01969-0).
- Morohashi, A., M. Satake, H. Naoki, H. F. Kaspar, Y. Oshima et T. Yasumoto. 1999. "Brevetoxin B4 isolated from greenshell mussels *Perna canaliculus*, the major toxin involved in neurotoxic shellfish poisoning in New Zealand." *Natural Toxins* 7 (2): 45-48. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-7189\(199903/04\)7:2<45::AID-NT34>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-7189(199903/04)7:2<45::AID-NT34>3.0.CO;2-H).
- Morris, P. D., D. S. Campbell, T. J. Taylor et J. I. Freeman. 1991. "Clinical and epidemiological features of neurotoxic shellfish poisoning in North Carolina." *American journal of public health* 81 (4): 471-474. <https://doi.org/10.2105/ajph.81.4.471>.
- Mouri, R., T. Oishi, K. Torikai, S. Ujihara, N. Matsumori, M. Murata et Y. Oshima. 2009. "Surface plasmon resonance-based detection of ladder-shaped polyethers by inhibition detection method." *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 19 (10): 2824-2828. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.03.103>.
- Murata, K., M. Satake, H. Naoki, H. F. Kaspar et T. Yasumoto. 1998. "Isolation and structure of a new brevetoxin analog, brevetoxin B2, from greenshell mussels from New Zealand." *Tetrahedron* 54 (5-6): 735-742. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(97\)10336-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(97)10336-2).
- Murrell, R. N. et J. E. Gibson. 2009. "Brevetoxins 2, 3, 6, and 9 show variability in potency and cause significant induction of DNA damage and apoptosis in Jurkat E6-1 cells." *Archives of Toxicology* 83 (11): 1009-1019. <https://doi.org/10.1007/s00204-009-0443-x>.
- Murrell, R. N. et J. E. Gibson. 2011. "Brevetoxin 2 alters expression of apoptotic, DNA damage, and cytokine genes in Jurkat cells." *Human and Experimental Toxicology* 30 (3): 182-191. <https://doi.org/10.1177/0960327110372644>.
- Myers, T. L., E. K. Prince, J. Naar et J. Kubanek. 2008. "Loss of waterborne brevetoxins from exposure to phytoplankton competitors." *Harmful Algae* 7 (6): 762-771. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.03.001>.
- Naar, J., A. Bourdelais, C. Tomas, J. Kubanek, P. L. Whitney, L. Flewelling, J. L. Karen Steidinger et D. G. Baden. 2002. "A competitive ELISA to detect brevetoxins from *Karenia brevis* (formerly *Gymnodinium breve*) in seawater, shellfish, and mammalian body fluid." *Environmental Health Perspectives* 110 (2): 179-185. <https://doi.org/10.1289/ehp.02110179>.
- Naar, J. P., L. J. Flewelling, A. Lenzi, J. P. Abbott, A. Granholm, H. M. Jacocks, D. Gannon, M. Henry, R. Pierce, D. G. Baden, J. Wolny et J. H. Landsberg. 2007. "Brevetoxins, like ciguatoxins, are potent ichthyotoxic neurotoxins that accumulate in fish." *Toxicon* 50 (5): 707-23. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.06.005>.
- Naar, J., A. Weidner et D. G. Baden. 2004. "Competitive ELISA: An Accurate, Quick and Effective Tool to Monitor Brevetoxins in Environmental and Biological Sample." *Harmful Algae* 2002 (2002) 10: 291-293.

- Naito, Kanako, Masakazu Matsui et Ichiro Imai. 2005. "Influence of iron chelation with organic ligands on the growth of red tide phytoplankton." *Plankton Biology and Ecology* 52 (1): 14-26.
- Nakamura, Yasuo et Makoto M Watanabe. 1983. "Growth characteristics of *Chattonella antiqua* (Raphidophyceae)." *Journal of the Oceanographical Society of Japan* 39 (3): 110-114.
- Nakanishi, K. 1985. "The chemistry of brevetoxins: A review." *Toxicon* 23 (3): 473-479. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(85\)90031-5](https://doi.org/10.1016/0041-0101(85)90031-5).
- Nam, D. H., D. H. Adams, L. J. Flewelling et N. Basu. 2010. "Neurochemical alterations in lemon shark (*Negaprion brevirostris*) brains in association with brevetoxin exposure." *Aquatic Toxicology* 99 (3): 351-359. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.05.014>.
- Neaud-Masson, Nadine. 2020. *Observation et dénombrement du phytoplancton marin par microscopie optique. Spécifications techniques et méthodologiques appliquées au REPHY*. Ifremer. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00609/72133/>.
- Neaud-Masson, Nadine et Melanie Brun. 2020. *Essai d'aptitude par comparaison Inter-analystes pour l'évaluation des performances en identification et dénombrement du phytoplancton marin. Rapport d'évaluation compétences des analystes du phytoplancton dans le cadre du réseau d'observation et de surveillance du phytoplancton et de l'hydrologie (REPHY) mis en œuvre par l'Ifremer. Exercice 2019*. Ifremer. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00665/77674/>.
- Nézan, Elisabeth, Raffaele Siano, Sylviane Boulben, Christophe Six, Gwenael Bilien, Karine Chèze, Audrey Duval, Sophie Le Panse, Julien Quéré et Nicolas Chomérat. 2014. "Genetic diversity of the harmful family Kareniaceae (Gymnodiniales, Dinophyceae) in France, with the description of *Karlodinium gentienii* sp. nov.: A new potentially toxic dinoflagellate." *Harmful Algae* 40: 75-91. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.10.006>.
- Nozawa, A., K. Tsuji et H. Ishida. 2003. "Implication of brevetoxin B1 and PbTx-3 in neurotoxic shellfish poisoning in New Zealand by isolation and quantitative determination with liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *Toxicon* 42 (1): 91-103. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(03\)00123-5](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(03)00123-5).
- NSW Government. 2015. *Marine Biotoxin Management Plan - NSW Shellfish Program*. foodauthority.nsw.gov.au.
- Núñez-Vázquez, EJ, C Ramírez-Camarena, CA Poot-Delgado, A Almazán-Becerril, JA Aké-Castillo, A Pérez-Morales, FE Hernández-Sandoval, LJ Fernández-Herrera, A Heredia-Tapia et C Band-Schmidt. 2016. "Toxinas marinas en el Golfo de México: orígenes e impactos." *FloreCIMIENTOS algales nocivos en México. CICESE, Ensenada, México*: 308-321.
- Nuñez Ortega, DA. 1879. "Ensayo de una explicacion del origen de las grandes mortandades de peces en el Golfo de Mexico." *La Naturaleza* 6: 188-197.
- O'Shea, T. J., G. B. Rathbun, R. K. Bonde, C. D. Buergelt et D. K. Odell. 1991. "An epizootic of Florida manatees associated with a dinoflagellate bloom." *Marine Mammal Science* 7 (2): 165-179. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.1991.tb00563.x>.
- OCDE. 1997a. *Essai n° 424: Étude de neurotoxicité*.
- OCDE. 1997b. *Essai n° 471: Essai de mutation réverse sur des bactéries*.
- OCDE. 2007. *Essai n° 426 : Étude de neurotoxicité pour le développement*.
- OCDE. 2008. *Essai n° 407: Toxicité orale à doses répétées - pendant 28 jours sur les rongeurs*.
- OCDE. 2010. *Essai n° 417: Toxicocinétique*.
- OCDE. 2016a. *Essai n° 476 : Essais in vitro de mutation génique sur cellules de mammifères utilisant les gènes Hprt et xprt*.
- OCDE. 2016b. *Essai n° 487 : Essai in vitro de micronoyaux sur cellules de mammifères*.
- OCDE. 2016c. *Essai n° 489 : Test des Comètes In Vivo en Conditions Alcalines sur Cellules de Mammifères*.
- OCDE. 2016d. *Essai n° 490 : Essai In Vitro de Mutation Génique Sur Cellules de Mammifères Utilisant le Gène de la Thymidine Kinase*.
- OCDE. 2018a. *Essai n° 408: Toxicité orale à doses répétées - rongeurs: 90 jours*.
- OCDE. 2018b. *Essai n° 414: Étude de la toxicité pour le développement prénatal*.
- Oda, M. 1935. "Gymnodinium mikimotoi Miyake et Kominami n. sp. (MS.) no akashiwo to ryusando no koka. (The red tide of *Gymnodinium mikimotoi* Miyake et Kominami and the influence of copper sulfate on the red tide of November 1972)." *Zoo. Mag.* 47: 35-48.

- Oda, Tatsuya, Atsushi Nakamura, Midori Shikayama, Ienobu Kawano, Atsushi Ishimatsu et Tsuyoshi Muramatsu. 1997. "Generation of reactive oxygen species by raphidophycean phytoplankton." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 61 (10): 1658-1662.
- OSPAR. 2000. *Quality Status Report 2000: Region II: Greater North Sea*. OSPAR Commission for the Protection of the Marine Environment of the North
- Otero, Alberto, María-José Chapela, Miroslava Atanassova, Juan M Vieites et Ana G Cabado. 2011. "Cyclic imines: Chemistry and mechanism of action: A review." *Chemical Research in Toxicology* 24 (11): 1817-1829.
- Pérez-Morales, Alfredo et Christine Johanna Band-Schmidt. 2011. "Brevetoxinas en las costas de México: efectos potenciales en la salud pública." *CICIMAR Océánides* 26 (2): 59-68.
- Pérez Linares, J., J. L. Ochoa et A. Gago Martínez. 2009. "Retention and tissue damage of PSP and NSP toxins in shrimp: Is cultured shrimp a potential vector of toxins to human population?" *Toxicon* 53 (2): 185-195. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.10.022>.
- Perrault, J. R., K. D. Bauman, T. M. Greenan, P. C. Blum, M. S. Henry et C. J. Walsh. 2016. "Maternal transfer and sublethal immune system effects of brevetoxin exposure in nesting loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) from western Florida." *Aquatic Toxicology* 180: 131-140. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.09.020>.
- Perrault, J. R., N. I. Stacy, A. F. Lehner, C. R. Mott, S. Hirsch, J. C. Gorham, J. P. Buchweitz, M. J. Bresette et C. J. Walsh. 2017. "Potential effects of brevetoxins and toxic elements on various health variables in Kemp's ridley (*Lepidochelys kempii*) and green (*Chelonia mydas*) sea turtles after a red tide bloom event." *Science of the Total Environment* 605-606: 967-979. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.149>.
- Perrault, Justin R., Jeffrey R. Schmid, Catherine J. Walsh, Jennifer E. Yordy et Anton D. Tucker. 2014. "Brevetoxin exposure, superoxide dismutase activity and plasma protein electrophoretic profiles in wild-caught Kemp's ridley sea turtles (*Lepidochelys kempii*) in southwest Florida." *Harmful Algae* 37: 194-202. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.06.007>.
- Phillips, Ayanna Carla Natasha. 2009. "Molecular responses of normal and neoplastic epithelial cells to brevetoxin-3 (PbTx-3) exposure." University of Florida.
- Pierce, R. H., M. S. Henry, P. C. Blum, S. L. Hamel, B. Kirkpatrick, Y. S. Cheng, Y. Zhou, C. M. Irvin, J. Naar, A. Weidner, L. E. Fleming, L. C. Backer et D. G. Baden. 2005. "Brevetoxin composition in water and marine aerosol along a Florida beach: Assessing potential human exposure to marine biotoxins." *Harmful Algae* 4 (6): 965-972. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2004.11.004>.
- Pierce, R. H., M. S. Henry, P. C. Blum, J. Lyons, Y. S. Cheng, D. Yazzie et Y. Zhou. 2003. "Brevetoxin concentrations in marine aerosol: Human exposure levels during a *Karenia brevis* harmful algal bloom." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 70 (1): 161-165. <https://doi.org/10.1007/s00128-002-0170-y>.
- Pierce, R. H., M. S. Henry, L. S. Proffitt et A. J. deRosset. 1992. "Evaluation of solid sorbents for the recovery of polyether toxins (brevetoxins) in seawater." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 49 (4): 479-484. <https://doi.org/10.1007/BF00196286>.
- Pierce, R., M. Henry et P. Blum. 2008. "Brevetoxin abundance and composition during ECOHAB-Florida field monitoring cruises in the Gulf of Mexico." *Continental Shelf Research* 28 (1): 45-58. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2007.04.012>.
- Pierce, R.H., M.S. Henry, P.C. Blum, S.M. Plakas, H.R. Granada, E.L.E. Jester, K.R. El Said, R.W. Dickey, S.A. Steidinger, P.S. Scott, L.J. Flewelling et J.L.C. Wright. 2006. "Comparison of methods for determination of brevetoxins and their metabolites in nsp-toxic bivalve molluscs." Proceedings of the 5th International Conference on Molluscan Shellfish Safety, Galway, Ireland, , June 14–18, 2004.
- Plakas, S. M. et R. W. Dickey. 2010. "Advances in monitoring and toxicity assessment of brevetoxins in molluscan shellfish." *Toxicon* 56 (2): 137-149. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.11.007>.
- Plakas, S. M., K. R. El Said, E. L. E. Jester, H. Ray Granada, S. M. Musser et R. W. Dickey. 2002. "Confirmation of brevetoxin metabolism in the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) by controlled exposures to pure toxins and to *Karenia brevis* cultures." *Toxicon* 40 (6): 721-729. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00267-7](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00267-7).

- Plakas, S. M., E. L. E. Jester, K. R. El Said, H. R. Granade, A. Abraham, R. W. Dickey, P. S. Scott, L. J. Flewelling, M. Henry, P. Blum et R. Pierce. 2008. "Monitoring of brevetoxins in the *Karenia brevis* bloom-exposed Eastern oyster (*Crassostrea virginica*)." *Toxicon* 52 (1): 32-38. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.04.174>.
- Plakas, S. M., Z. Wang, K. R. El Said, E. L. E. Jester, H. R. Granade, L. Flewelling, P. Scott et R. W. Dickey. 2004. "Brevetoxin metabolism and elimination in the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) after controlled exposures to *Karenia brevis*." *Toxicon* 44 (6): 677-685. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.07.027>.
- Poli, M. A., T. J. Mende et D. G. Baden. 1986. "Brevetoxins, unique activators of voltage-sensitive sodium channels, bind to specific sites in rat brain synaptosomes." *Molecular Pharmacology* 30 (2): 129-135.
- Poli, M. A., S. M. Musser, R. W. Dickey, P. P. Eilers et S. Hall. 2000. "Neurotoxic shellfish poisoning and brevetoxin metabolites: A case study from Florida." *Toxicon* 38 (7): 981-993. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(99\)00191-9](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(99)00191-9).
- Poli, M. A., K. S. Rein et D. G. Baden. 1995. "Radioimmunoassay for PbTx-2-type brevetoxins: epitope specificity of two anti-PbTx sera." *Journal of AOAC International* 78 (2): 538-542.
- Poli, M. A., C. B. Templeton, W. L. Thompson et J. F. Hewetson. 1990. "Distribution and elimination of brevetoxin PbTx-3 in rats." *Toxicon* 28 (8): 903-910. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(90\)90020-8](https://doi.org/10.1016/0041-0101(90)90020-8).
- Poli, Mark A, CB Templeton, WL Thompson et JF Hewetson. 1989. *Clearance, Distribution, and Elimination of the Brevetoxin PbTx-3 in Rats*. ARMY MEDICAL RESEARCH INST OF INFECTIOUS DISEASES FORT DETRICK MD.
- Pouil, S., R. J. Clausing, M. Metian, P. Bustamante et M. Y. Dechraoui-Bottein. 2018. "A study of the influence of brevetoxin exposure on trace element bioaccumulation in the blue mussel *Mytilus edulis*." *Journal of Environmental Radioactivity* 192: 250-256. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2018.06.008>.
- Prasad, AV Krishna et Yuzuru Shimizu. 1989. "The structure of hemibrevetoxin-B: a new type of toxin in the Gulf of Mexico red tide organism." *Journal of the American Chemical Society* 111 (16): 6476-6477.
- Prince, Emily K, Liliana Lettieri, Katherine J McCurdy et Julia Kubanek. 2006. "Fitness consequences for copepods feeding on a red tide dinoflagellate: deciphering the effects of nutritional value, toxicity, and feeding behavior." *Oecologia* 147 (3): 479-488.
- Radwan, F. F. Y. et J. S. Ramsdell. 2008. "Brevetoxin forms covalent DNA adducts in rat lung following intratracheal exposure." *Environmental Health Perspectives* 116 (7): 930-936. <https://doi.org/10.1289/ehp.11068>.
- Ramsdell, J. S. 2008. "The molecular and integrative basis to brevetoxin toxicity." Dans *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection, Second Edition*, 519-550.
- Redshaw, C. H., D. A. Sutter, K. Lim-Hing, M. L. Heckman, S. L. Jakobsson, J. Naar et J. Kubanek. 2011. "Tracking losses of brevetoxins on exposure to phytoplankton competitors: Ecological impacts." *Harmful Algae* 12: 119-124. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.09.007>.
- Reich, A., R. Lazensky, J. Faris, L. E. Fleming, B. Kirkpatrick, S. Watkins, S. Ullmann, K. Kohler et P. Hoagland. 2015. "Assessing the impact of shellfish harvesting area closures on neurotoxic shellfish poisoning (NSP) incidence during red tide (*Karenia brevis*) blooms." *Harmful Algae* 43: 13-19. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.12.003>.
- REPHY. 2019. REPHY dataset - French Observation and Monitoring program for Phytoplankton and Hydrology in coastal waters. Metropolitan data. édité par French Observation and Monitoring program for Phytoplankton and Hydrology in coastal waters: SEANOE.
- Reynolds, D. A., M. J. Yoo, D. L. Dixson et C. Ross. 2020. "Exposure to the Florida red tide dinoflagellate, *Karenia brevis*, and its associated brevetoxins induces ecophysiological and proteomic alterations in *Porites astreoides*." *PLoS ONE* 15 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228414>.
- Roberts, BS, GE Henderson et RA Medlyn. 1979. "Effect of *Gymnodinium breve* toxins on selected mollusks and crustaceans." *Developments in marine biology*.
- Rolton, A., P. Soudant, J. Vignier, R. Pierce, M. Henry, S. E. Shumway, V. M. Bricelj et A. K. Volety. 2015. "Susceptibility of gametes and embryos of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*,

- to *Karenia brevis* and its toxins." *Toxicon* 99: 6-15. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.03.002>.
- Rolton, A., J. Vignier, P. Soudant, S. E. Shumway, V. M. Bricelj et A. K. Volety. 2014. "Effects of the red tide dinoflagellate, *Karenia brevis*, on early development of the eastern oyster *Crassostrea virginica* and northern quahog *Mercenaria mercenaria*." *Aquatic Toxicology* 155: 199-206. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.06.023>.
- Rolton, A., J. Vignier, A. Volety, S. Shumway, V. M. Bricelj et P. Soudant. 2018. "Impacts of exposure to the toxic dinoflagellate *Karenia brevis* on reproduction of the northern quahog, *Mercenaria mercenaria*." *Aquatic Toxicology* 202: 153-162. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.07.007>.
- Ross, C., R. Ritson-Williams, R. Pierce, J. B. Bullington, M. Henry et V. J. Paul. 2010. "Effects of the Florida red tide dinoflagellate, *Karenia brevis*, on oxidative stress and metamorphosis of larvae of the coral *Porites astreoides*." *Harmful Algae* 9 (2): 173-179. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2009.09.001>.
- Roszell, LE, LS Schulman et DG Baden. 1990. "Toxin profiles are dependent on growth stages in cultured *Ptychodiscus brevis*."
- Roth, P. B., M. J. Twiner, Z. Wang, M. Y. Bottein Dechraoui et G. J. Doucette. 2007. "Fate and distribution of brevetoxin (PbTx) following lysis of *Karenia brevis* by algicidal bacteria, including analysis of open A-ring derivatives." *Toxicon* 50 (8): 1175-1191. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.08.003>.
- Salierno, J. D. et A. S. Kane. 2019. "Brevetoxin and saxitoxin alter shoaling dynamics in mummichog, *Fundulus heteroclitus*." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 520. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2019.151210>.
- Satake, M., R. Irie, Y. Hamamoto, K. Tachibana, P. T. Holland, D. T. Harwood, F. Shi, V. Beuzenberg, Y. Itoh, F. Hayashi et H. P. Zhang. 2018. "Brevisulcinal-G, -H, and -I, polycyclic ether marine toxins from the dinoflagellate *Karenia brevisulcata*." *Heterocycles* 96 (12): 2096-2105. <https://doi.org/10.3987/com-18-14014>.
- Satake, Masayuki, Andrea J Bourdelais, Ryan M Van Wagoner, Daniel G Baden et Jeffrey LC Wright. 2008. "Brevisamide: an unprecedented monocyclic ether alkaloid from the dinoflagellate *Karenia brevis* that provides a potential model for ladder-frame initiation." *Organic letters* 10 (16): 3465-3468.
- Satake, Masayuki, Mitsuha Shoji, Yasukatsu Oshima, Hideo Naoki, Tsuyoshi Fujita et Takeshi Yasumoto. 2002. "Gymnocin-A, a cytotoxic polyether from the notorious red tide dinoflagellate, *Gymnodinium mikimotoi*." *Tetrahedron letters* 43 (33): 5829-5832.
- Satake, Masayuki, Yoshihisa Tanaka, Yuki Ishikura, Yasukatsu Oshima, Hideo Naoki et Takeshi Yasumoto. 2005. "Gymnocin-B with the largest contiguous polyether rings from the red tide dinoflagellate, *Karenia* (formerly *Gymnodinium*) *mikimotoi*." *Tetrahedron Letters* 46 (20): 3537-3540.
- Sayer, A., Q. Hu, A. J. Bourdelais, D. G. Baden et J. E. Gibson. 2005. "The effect of brevenal on brevetoxin-induced DNA damage in human lymphocytes." *Archives of Toxicology* 79 (11): 683-688. <https://doi.org/10.1007/s00204-005-0676-2>.
- Sayer, A. N., Q. Hu, A. J. Bourdelais, D. G. Baden et J. E. Gibson. 2006. "The inhibition of CHO-K1-BH4 cell proliferation and induction of chromosomal aberrations by brevetoxins in vitro." *Food and Chemical Toxicology* 44 (7): 1082-1091. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.01.002>.
- Schalie, William van der, Tom Shedd, Mark Widder, Andrew Kane et Ellen Silbergeld. 2001. *Real-Time Monitoring for Toxicity Caused by Harmful Algal Blooms and Other Water Quality Perturbations*. ARMY CENTER FOR ENVIRONMENTAL HEALTH RESEARCH FORT DETRICK MD.
- Schreibmayer, W. et G. Jeglitsch. 1992. "The sodium channel activator Brevetoxin-3 uncovers a multiplicity of different open states of the cardiac sodium channel." *BBA - Biomembranes* 1104 (2): 233-242. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(92\)90035-K](https://doi.org/10.1016/0005-2736(92)90035-K).
- Schwacke, L. H., M. J. Twiner, S. De Guise, B. C. Balmer, R. S. Wells, F. I. Townsend, D. C. Rotstein, R. A. Varela, L. J. Hansen, E. S. Zolman, T. R. Spradlin, M. Levin, H. Leibrecht, Z. Wang et T. K. Rowles. 2010. "Eosinophilia and biotoxin exposure in bottlenose dolphins (*Tursiops*

- truncatus) from a coastal area impacted by repeated mortality events." *Environ Res* 110 (6): 548-55. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2010.05.003>.
- Seki, Tetsuya, Masayuki Satake, Lincoln Mackenzie, Heinrich F Kaspar et Takeshi Yasumoto. 1995. "Gymnodimine, a new marine toxin of unprecedented structure isolated from New Zealand oysters and the dinoflagellate, *Gymnodinium* sp." *Tetrahedron letters* 36 (39): 7093-7096.
- Selwood, A. I., R. Van Ginkel, A. L. Wilkins, R. Munday, J. S. Ramsdell, D. J. Jensen, J. M. Cooney et C. O. Miles. 2008. "Semisynthesis of S-desoxybrevetoxin-B2 and brevetoxin-B2, and assessment of their acute toxicities." *Chemical Research in Toxicology* 21 (4): 944-950. <https://doi.org/10.1021/tx700441w>.
- Shea, D. 1997. "Analysis of brevetoxins by micellar electrokinetic capillary chromatography and laser-induced fluorescence detection." *Electrophoresis* 18 (2): 277-283. <https://doi.org/10.1002/elps.1150180216>.
- Shen, M., J. Xu, T. Y. Tsang et D. W. T. Au. 2010. "Toxicity comparison between *Chattonella marina* and *Karenia brevis* using marine medaka (*Oryzias melastigma*): Evidence against the suspected ichthyotoxins of *Chattonella marina*." *Chemosphere* 80 (5): 585-591. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.03.051>.
- Sheridan, R. E. et M. Adler. 1989. "The actions of a red tide toxin from *Ptychodiscus brevis* on single sodium channels in mammalian neuroblastoma cells." *FEBS Letters* 247 (2): 448-452. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)81389-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)81389-4).
- Shi, F., P. McNabb, L. Rhodes, P. Holland, S. Webb, J. Adamson, A. Immers, R. Gooneratne et J. Holland. 2012. "The toxic effects of three dinoflagellate species from the genus *Karenia* on invertebrate larvae and finfish." *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 46 (2): 149-165. <https://doi.org/10.1080/00288330.2011.616210>.
- Shikata, Tomoyuki, Shigeru Matsunaga, Mineo Iseki, Hiroyo Nishide, Sho-Ichi Higashi, Yasuhiro Kamei, Mineo Yamaguchi, Ian R Jenkinson et Masakatsu Watanabe. 2013. "Blue light regulates the rhythm of diurnal vertical migration in the raphidophyte red-tide alga *Chattonella antiqua*." *Journal of plankton research* 35 (3): 542-552.
- Shikata, Tomoyuki, Sou Nagasoe, Tadashi Matsubara, Souta Yoshikawa, Yasuhiro Yamasaki, Yohei Shimasaki, Yuji Oshima, Ian R Jenkinson et Tsuneo Honjo. 2008a. "Factors influencing the initiation of blooms of the raphidophyte *Heterosigma akashiwo* and the diatom *Skeletonema costatum* in a port in Japan." *Limnology and Oceanography* 53 (6): 2503-2518.
- Shikata, Tomoyuki, Souta Yoshikawa, Tadashi Matsubara, Wataru Tanoue, Yasuhiro Yamasaki, Yohei Shimasaki, Yukihiko Matsuyama, Yuji Oshima, Ian R Jenkinson et Tsuneo Honjo. 2008b. "Growth dynamics of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) in Hakata Bay, Japan." *European Journal of Phycology* 43 (4): 395-411.
- Shimizu, Y., H. N. Chou, H. Bando, G. V. Duyne et J. C. Clardy. 1986. "Structure of Brevetoxin A (GB-1 Toxin), the Most Potent Toxin in the Florida Red Tide Organism *Gymnodinium breve* (*Ptychodiscus brevis*)." *Journal of the American Chemical Society* 108 (3): 514-515. <https://doi.org/10.1021/ja00263a031>.
- Shimizu, Yuzuru. 1982. "Recent Progress in Marine Toxin Research."
- Shin, C., J. Y. Hwang, J. H. Yoon, S. H. Kim et G. J. Kang. 2018. "Simultaneous determination of neurotoxic shellfish toxins (brevetoxins) in commercial shellfish by liquid chromatography tandem mass spectrometry." *Food Control* 91: 365-371. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.017>.
- Shinnick-Gallagher, Patricia. 1980. "Possible mechanisms of action of *Gymnodinium breve* toxin at the mammalian neuromuscular junction." *British journal of pharmacology* 69 (3): 373.
- Speckmann, Christa L, Cammie J Hyatt et Edward J Buskey. 2006. "Effects of *Karenia brevis* diet on RNA: DNA ratios and egg production of *Acartia tonsa*." *Harmful Algae* 5 (6): 693-704.
- Steidinger, Karen A, Paul Carlson, Daniel Baden, Cesar Rodriguez et James Seagle. 1998. "Neurotoxic shellfish poisoning due to toxin retention in the clam *Chione cancellata*." *Harmful algae* 6 (3): 457-8.
- Stumpf, RP, ME Culver, PA Tester, M Tomlinson, GJ Kirkpatrick, BA Pederson, E Truby, V Ransibrahmanakul et M Soracco. 2003. "Monitoring *Karenia brevis* blooms in the Gulf of Mexico using satellite ocean color imagery and other data." *Harmful Algae* 2 (2): 147-160.

- Subrahmanyam, R. 1954. "On the life-history and ecology of *Hornellia marina* gen. et sp. nov., (Chloromonadineae), causing green discoloration of the sea and mortality among marine organisms off the Malabar Coast." *Indian Journal of Fisheries* 1 (1&2): 182-203.
- Summerson, Henry C et Charles H Peterson. 1990. "Recruitment failure of the bay scallop, *Argopecten irradians concentricus*, during the first red tide, *Ptychodiscus brevis*, outbreak recorded in North Carolina." *Estuaries* 13 (3): 322-331.
- Sunda, W. G., C. Burleson, D. Ransom Hardison, J. S. Morey, Z. Wang, J. Wolny, A. A. Corcoran, L. J. Flewelling et F. M. Van Dolah. 2013. "Osmotic stress does not trigger brevetoxin production in the dinoflagellate *Karenia brevis*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (25): 10223-10228. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217716110>.
- Suzuki, R., R. Irie, Y. Harntaweewsup, K. Tachibana, P. T. Holland, D. T. Harwood, F. Shi, V. Beuzenberg, Y. Itoh, S. Pascal, P. J. B. Edwards et M. Satake. 2014. "Brevissulcatic acids, marine ladder-frame polyethers from the red tide dinoflagellate *Karenia brevisulcata* in New Zealand." *Organic Letters* 16 (22): 5850-5853. <https://doi.org/10.1021/ol502700h>.
- Takayama, H et R Adachi. 1984. "*Gymnodinium nagasakiense* sp. nov., a red-tide forming dinophyte in the adjacent waters of Japan." *Bulletin of Plankton Society of Japan (Japan)*.
- Takayama, H. 1985. "Apical grooves of unarmored dinoflagellates." 32.
- Tanaka, Yoshihisa, Masayuki Satake, Mari Yotsu-Yamashita et Yasukatsu Oshima. 2013. "Gymnocin-A carboxylic acid and gymnocin-A2, cytotoxic polyethers from the red tide dinoflagellate *Karenia mikimotoi*." *Heterocycles* 87 (10): 2037-2046.
- Templeton, C. B., M. A. Poli et R. D. LeClaire. 1989. "Cardiorespiratory effects of brevetoxin (PbTx-2) in conscious, tethered rats." *Toxicon* 27 (9): 1043-1049. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(89\)90155-4](https://doi.org/10.1016/0041-0101(89)90155-4).
- Terzagian, R. 2006. "Five Cluster of Neurotoxic Shellfish Poisoning (NSP) in Lee County, July 2006." *Florida Department of Health Epi Updates*.
- Tester, Patricia A et Patricia K Fowler. 1990. "Brevetoxin contamination of *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea virginica*: A management issue."
- Tester, Patricia A, Jefferson T Turner et Damian Shea. 2000. "Vectorial transport of toxins from the dinoflagellate *Gymnodinium breve* through copepods to fish." *Journal of Plankton Research* 22 (1): 47-62.
- Tian, L., M. Wang, X. Li, P. K. S. Lam, M. Wang, D. Wang, H. N. Chou, Y. Li et L. L. Chan. 2011. "Proteomic modification in gills and brains of medaka fish (*Oryzias melastigma*) after exposure to a sodium channel activator neurotoxin, brevetoxin-1." *Aquatic Toxicology* 104 (3-4): 211-217. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.04.019>.
- Tice, Raymond R, E Agurell, D Anderson, B Burlinson, A Hartmann, H Kobayashi, Y Miyamae, E Rojas, J-C Ryu et YF Sasaki. 2000. "Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing." *Environmental and molecular mutagenesis* 35 (3): 206-221.
- Todd, K. 2002. "A review of NSP monitoring in New Zealand in support of a new programme." *Cawthron Institute: Nelson, New Zealand*.
- Tomas, Carmelo R. 1978. "*Olisthodiscus luteus* (Chrysophyceae) [Algae]. I. Effects of salinity and temperature on growth, motility and survival." *Journal of Phycology* 14 (3): 309-313.
- Tomas, Carmelo R. 1997. *Identifying marine phytoplankton*. Elsevier.
- Trainer, V. L., D. G. Baden et W. A. Catterall. 1994. "Identification of peptide components of the brevetoxin receptor site of rat brain sodium channels." *Journal of Biological Chemistry* 269 (31): 19904-19909.
- Trainer, V. L., D. G. Baden et W. A. Catterall. 1995. "Detection of marine toxins using reconstituted sodium channels." *Journal of AOAC International* 78 (2): 570-573.
- Trimmer, James S et Kenneth J Rhodes. 2004. "Localization of voltage-gated ion channels in mammalian brain." *Annu. Rev. Physiol.* 66: 477-519.
- Truman, P., D. J. Stirling, P. Northcote, R. J. Lake, C. Seamer et D. J. Hannah. 2002. "Determination of brevetoxins in shellfish by the neuroblastoma assay." *Journal of AOAC International* 85 (5): 1057-1063.

- Truxal, L. T., A. J. Bourdelais, H. Jacocks, W. M. Abraham et D. G. Baden. 2010. "Characterization of tamulamides A and B, polyethers isolated from the marine dinoflagellate *karenia brevis*." *Journal of Natural Products* 73 (4): 536-540. <https://doi.org/10.1021/np900541w>.
- Turner, A. D., C. Higgins, K. Davidson, A. Veszelszki, D. Payne, J. Hungerford et W. Higman. 2015. "Potential threats posed by new or emerging marine biotoxins in UK waters and examination of detection methodology used in their control: Brevetoxins." *Marine Drugs* 13 (3): 1224-1254. <https://doi.org/10.3390/md13031224>.
- Turner, Jefferson T. 2014. "Planktonic marine copepods and harmful algae." *Harmful Algae* 32: 81-93.
- Twiner, M. J., M. Y. Bottein Dechraoui, Z. Wang, C. M. Mikulski, M. S. Henry, R. H. Pierce et G. J. Doucette. 2007. "Extraction and analysis of lipophilic brevetoxins from the red tide dinoflagellate *Karenia brevis*." *Analytical Biochemistry* 369 (1): 128-135. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.06.031>.
- Twiner, M. J., S. Fire, L. Schwacke, L. Davidson, Z. Wang, S. Morton, S. Roth, B. Balmer, T. K. Rowles et R. S. Wells. 2011. "Concurrent exposure of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) to multiple algal toxins in Sarasota Bay, Florida, USA." *PLoS ONE* 6 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017394>.
- Twiner, M. J., L. J. Flewelling, S. E. Fire, S. R. Bowen-Stevens, J. K. Gaydos, C. K. Johnson, J. H. Landsberg, T. A. Leighfield, B. Mase-Guthrie, L. Schwacke, F. M. Van Dolah, Z. Wang et T. K. Rowles. 2012. "Comparative analysis of three brevetoxin-associated bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) mortality events in the Florida Panhandle region (USA)." *PLoS One* 7 (8): e42974. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042974>.
- Twiner, Michael J, Peter Chidiac, S Jeffrey Dixon et Charles G Trick. 2005. "Extracellular organic compounds from the ichthyotoxic red tide alga *Heterosigma akashiwo* elevate cytosolic calcium and induce apoptosis in Sf9 cells." *Harmful Algae* 4 (4): 789-800.
- Utermöhl, Hans. 1958. "Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplankton-methodik: Mit 1 Tabelle und 15 abbildungen im Text und auf 1 Tafel." *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Mitteilungen* 9 (1): 1-38.
- Van Der Kloot, William et Jordi Molgo. 1994. "Quantal acetylcholine release at the vertebrate neuromuscular junction." *Physiological reviews* 74 (4): 899-991.
- Van Deventer, M., K. Atwood, G. A. Vargo, L. J. Flewelling, J. H. Landsberg, J. P. Naar et D. Stanek. 2012. "Karenia brevis red tides and brevetoxin-contaminated fish: A high risk factor for Florida's scavenging shorebirds?" *Botanica Marina* 55 (1): 31-37. <https://doi.org/10.1515/BOT.2011.122>.
- Van Deventer, Michelle. 2007. "Brevetoxins in marine birds: Evidence of trophic transfer and the role of prey fish as toxin vector."
- van Dolah, F. M., E. L. Finley, B. L. Haynes, G. J. Doucette, P. D. Moeller et J. S. Ramsdell. 1994. "Development of rapid and sensitive high throughput pharmacologic assays for marine phycotoxins." *Natural Toxins* 2 (4): 189-196. <https://doi.org/10.1002/nt.2620020407>.
- Van Dolah, F. M., K. B. Lidie, E. A. Monroe, D. Bhattacharya, L. Campbell, G. J. Doucette et D. Kamykowski. 2009. "The Florida red tide dinoflagellate *Karenia brevis*: New insights into cellular and molecular processes underlying bloom dynamics." *Harmful Algae* 8 (4): 562-572. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.11.004>.
- Van Wagoner, Ryan M, Masayuki Satake, Andrea J Bourdelais, Daniel G Baden et Jeffrey LC Wright. 2010. "Absolute configuration of brevisamide and brevisin: confirmation of a universal biosynthetic process for *Karenia brevis* polyethers." *Journal of natural products* 73 (6): 1177-1179.
- Viallon, J., M. Chinain et H. T. Darius. 2020. "Revisiting the Neuroblastoma Cell-Based Assay (CBA-N2a) for the Improved Detection of Marine Toxins Active on Voltage Gated Sodium Channels (VGSCs)." *Toxins* 12 (5). <https://doi.org/10.3390/toxins12050281>.
- Victorian Fisheries Authority. 2016. "Marine biotoxin management plan."
- Viviani, R. 1992. "Eutrophication, marine biotoxins, human health." *Science of the Total Environment* (SUPPL.): 631-662.
- Vrieling, EG, RPT Koeman, K Nagasaki, Y Ishida, L Pererzak, WWC Gieskes et M Veenhuis. 1995. "Chattonella and Fibrocapsa (Raphidophyceae): first observation of, potentially harmful, red

- tide organisms in Dutch coastal waters." *Netherlands Journal of Sea Research* 33 (2): 183-191.
- Waggett, Rebecca J, D Ransom Hardison et Patricia A Tester. 2012. "Toxicity and nutritional inadequacy of *Karenia brevis*: synergistic mechanisms disrupt top-down grazer control." *Marine Ecology Progress Series* 444: 15-30.
- Walsh, C. J., M. Butawan, J. Yordy, R. Ball, L. Flewelling, M. De Wit et R. K. Bonde. 2015. "Sublethal red tide toxin exposure in free-ranging manatees (*Trichechus manatus*) affects the immune system through reduced lymphocyte proliferation responses, inflammation, and oxidative stress." *Aquatic Toxicology* 161: 73-84. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.01.019>.
- Walsh, Catherine J, Joyce E Stuckey, Heather Cox, Brett Smith, Christina Funke, Jeff Stott, Clarence Colle, Joseph Gaspard et Charles A Manire. 2007. "Production of nitric oxide by peripheral blood mononuclear cells from the Florida manatee, *Trichechus manatus latirostris*." *Veterinary immunology and immunopathology* 118 (3-4): 199-209.
- Walsh, Cathy J, Carl A Luer et David R Noyes. 2005. "Effects of environmental stressors on lymphocyte proliferation in Florida manatees, *Trichechus manatus latirostris*." *Veterinary immunology and immunopathology* 103 (3-4): 247-256.
- Wang, J. Y., J. Y. Cen, S. Li, S. H. Lu, O. Moestrup, K. Chan, T. Jiang et X. D. Lei. 2018. "A re-investigation of the bloom-forming unarmored dinoflagellate *Karenia longicanalis* (syn. *Karenia umbella*) from Chinese coastal waters." *Journal of Oceanology and Limnology* 36 (6): 2202-2215. <https://doi.org/10.1007/s00343-019-7191-4>.
- Wang, Z. ;, S. M. Plakas, K. R. El Said, E. L. E. Jester, H. R. Granade et R. W. Dickey. 2004. "LC/MS analysis of brevetoxin metabolites in the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*)." *Toxicon* 43 (4): 455-465. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.02.017>.
- Wang, Zhao-hui, Yu Liang et Wei Kang. 2011a. "Utilization of dissolved organic phosphorus by different groups of phytoplankton taxa." *Harmful Algae* 12: 113-118.
- Wang, Zhaohui, Meiling Yuan, Yu Liang et Songhui Lu. 2011b. "Effects of temperature and organic and inorganic nutrients on the growth of *Chattonella marina* (Raphidophyceae) from the Daya Bay, South China Sea." *Acta Oceanologica Sinica* 30 (3): 124.
- Washburn, B. S., C. A. Vines, D. G. Baden, D. E. Hinton et P. J. Walsh. 1996. "Differential effects of brevetoxin and β -naphthoflavone on xenobiotic metabolizing enzymes in striped bass (*Morone saxatilis*)." *Aquatic Toxicology* 35 (1): 1-10. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(95\)00050-E](https://doi.org/10.1016/0166-445X(95)00050-E).
- Watanabe, MM, Y Nakamura et K Kohata. 1983. "Diurnal vertical migration and dark uptake of nitrate and phosphate of the red tide flagellates, *Heterosigma akashiwo* Hada and *Chattonella antiqua* (Hada) Ono (Raphidophyceae)." *Jap. J. Phycol* 31: 161-166.
- Watkins, S. M., A. Reich, L. E. Fleming et R. Hammond. 2008. "Neurotoxic shellfish poisoning." *Marine Drugs* 6 (3): 431-455. <https://doi.org/10.3390/md6030431>.
- Weng, X. et S. Neethirajan. 2018. "Paper-based microfluidic aptasensor for food safety." *Journal of Food Safety* 38 (1). <https://doi.org/10.1111/jfs.12412>.
- Wibe, Åsa Espmark, Trond Nordtug et Bjørn Munro Jenssen. 2001. "Effects of bis (tributyltin) oxide on antipredator behavior in threespine stickleback *Gasterosteus aculeatus* L." *Chemosphere* 44 (3): 475-481.
- Wolny, J. L., P. S. Scott, J. Tustison et C. R. Brooks. 2015. "Monitoring the 2007 Florida east coast *Karenia brevis* (Dinophyceae) red tide and neurotoxic shellfish poisoning (NSP) event." *Algae* 30 (1): 49-58. <https://doi.org/10.4490/algae.2015.30.1.049>.
- Woofter, R., M. Y. Bottein Dechraoui, I. Garthwaite, N. R. Towers, C. J. Gordon, J. Córdova et J. S. Ramsdell. 2003. "Measurement of brevetoxin levels by radioimmunoassay of blood collection cards after acute, long-term, and low-dose exposure in mice." *Environmental Health Perspectives* 111 (13): 1595-1600. <https://doi.org/10.1289/ehp.6166>.
- Woofter, R. T., K. Brendtro et J. S. Ramsdell. 2005. "Uptake and elimination of brevetoxin in blood of striped mullet (*Mugil cephalus*) after aqueous exposure to *Karenia brevis*." *Environmental Health Perspectives* 113 (1): 11-16. <https://doi.org/10.1289/ehp.7274>.
- Wu, C. H., J. M. C. Huang, S. M. Vogel, V. S. Luke, W. D. Atchison et T. Narahashi. 1985. "Actions of *Ptychodiscus brevis* toxins on nerve and muscle membranes." *Toxicon* 23 (3): 481-487. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(85\)90032-7](https://doi.org/10.1016/0041-0101(85)90032-7).

- Wu, H., M. Guo, Z. Tan, H. Cheng, Z. Li et Y. Zhai. 2014. "Liquid chromatography quadrupole linear ion trap mass spectrometry for multiclass screening and identification of lipophilic marine biotoxins in bivalve mollusks." *Journal of Chromatography A* 1358: 172-180. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.06.105>.
- Wu, Ni, Tian-Jiu Jiang et Tao Jiang. 2012. "Analyses of hemolytic toxin from ichthyotoxic phytoplankton *Chattonella marina* (Hong Kong Strain) by high performance liquid chromatography." *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 40 (8): 1.
- Yasumoto, T. 1989. "Screening for hemolytic and ichthyotoxic compounds in *Chrysochromulina polylepis* and *Gyrodinium aureolum* in Norwegian coastal waters." Proceedings of the 4th International Conference on Toxic Marine Phytoplankton, Lund, June 1989, New York.
- Yau, M. S., E. N. Y. Lei, I. H. M. Ng, C. K. K. Yuen, J. C. W. Lam et M. H. W. Lam. 2019. "Changes in the neurotransmitter profile in the central nervous system of marine medaka (*Oryzias melastigma*) after exposure to brevetoxin PbTx-1 – A multivariate approach to establish exposure biomarkers." *Science of the Total Environment* 673: 327-336. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.193>.
- Ye, W., T. Liu, W. Zhang, M. Zhu, Z. Liu, Y. Kong et S. Liu. 2019. "Marine toxins detection by biosensors based on aptamers." *Toxins* 12 (1). <https://doi.org/10.3390/toxins12010001>.
- Yoshimatsu, S. 1987. "The cysts of *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae) found in bottom sediment in Harima-Nada, Eastern Inland Sea of Japan." *Bulletin of Plankton Society of Japan (Japan)*.
- Young, Nick, Richard A. Sharpe, Rosa Barciela, Gordon Nichols, Keith Davidson, Elisa Berdalet et Lora E. Fleming. 2020. "Marine harmful algal blooms and human health: A systematic scoping review." *Harmful Algae* 98: 101901. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101901>.
- Yuhi, T., A. Wada, R. Yamamoto, M. Urabe, H. Niina, F. Izumi et T. Yanagita. 1994. "Characterization of [³H]brevetoxin binding to voltage-dependent sodium channels in adrenal medullary cells." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 350 (2): 209-212. <https://doi.org/10.1007/BF00241098>.
- Zendong, Z., P. McCarron, C. Herrenknecht, M. Sibat, Z. Amzil, R. B. Cole et P. Hess. 2015. "High resolution mass spectrometry for quantitative analysis and untargeted screening of algal toxins in mussels and passive samplers." *Journal of Chromatography A* 1416: 10-21. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.08.064>.
- Zendong, Zita, Christine Herrenknecht, Eric Abadie, Charline Brissard, Céline Tixier, Florence Mondeguer, Véronique Séchet, Zouher Amzil et Philipp Hess. 2014. "Extended evaluation of polymeric and lipophilic sorbents for passive sampling of marine toxins." *Toxicon* 91: 57-68.
- Zhang, Lijun, Lu Lu, Liye Shu, Jianjun Chen, Baobo Zou, Qi Zhou, Yuanliang Gu, Jinshun Zhao et Xialu Lin. 2015. "Association between the hygiene index values of live fresh aquatic products and food-borne diarrhea in the population of the ningbo area in China." *International journal of environmental research and public health* 12 (8): 9154-9168.
- Zhao, Yan, Xuexi Tang, Xiaowei Zhao et You Wang. 2017. "Effect of various nitrogen conditions on population growth, temporary cysts and cellular biochemical compositions of *Karenia mikimotoi*." *PloS one* 12 (2): e0171996.

10.2 Bibliographie pour les questions 5 (eaux récréatives et aérosols)

- Abraham, W. M., A. J. Bourdelais, A. Ahmed, I. Serebriakov, et D. G. Baden. 2005 "Effects of Inhaled Brevetoxins in Allergic Airways: Toxin-Allergen Interactions and Pharmacologic Intervention." [In eng]. *Environmental Health Perspectives* 113 (5): 632-637. <https://doi.org/10.1289/ehp.7498>.
- Abraham, W. M., A. J. Bourdelais, J. R. Sabater, A. Ahmed, T. A. Lee, I. Serebriakov, et D. G. Baden. 2005. "Airway Responses to Aerosolized Brevetoxins in an Animal Model of Asthma." [In eng]. *American journal of respiratory and critical care medicine* 171 (1) : 26-34. <https://dx.doi.org/10.1164%2Frcm.200406-735OC>
- Aké-Castillo, J., G. Campos Bautista, Y. Okolodkov, F. Ruiz-Rojas. 2011; " C-MANs and BreveBusters in Veracruz, Mexico (Gulf of Mexico)". *Harmful Algae News. The Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO* : 3-3;
- Anderson, D. M., P. Hoagland, Y. Kaoru, et A. W. White. 2000. "Estimated Annual Economic Impacts from Harmful Algal Blooms (Habs) in the United States." *National Oceanic and Atmospheric Administration Norman OK National Severe* . Technical report. https://www.whoi.edu/cms/files/Economics_report_18564_23050.pdf
- Anderson, D. M., E. Fensin, C. J. Gobler, A. E. Hoeglund, K. A. Hubbard, D. M. Kulis, J. H. Landsberg, et al. 2021."Marine Harmful Algal Blooms (Habs) in the United States: History, Current Status and Future Trends." *Harmful Algae* 102 : 101975. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2021.101975>
- Andronache, C. 2003 . "Estimated Variability of Below-Cloud Aerosol Removal by Rainfall for Observed Aerosol Size Distributions." *Atmospheric Chemistry and Physics* 3 (1): 131-143. <https://doi.org/10.5194/acp-3-131-2003>.
- Asai, S., J. J. Krzanowski, W. H. Anderson, D. F. Martin, J. B. Polson, R. F. Lockey, S. C. Bukantz, and A. Szentivanyi. 1982. "Effects of Toxin of Red Tide, *Ptychodiscus Brevis*, on Canine Tracheal Smooth Muscle: A Possible New Asthma-Triggering Mechanism." [In eng]. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 69 (5): 418-428. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(82\)90116-6](https://doi.org/10.1016/0091-6749(82)90116-6).
- Backer, L. C., L. E. Fleming, A. Rowan, Y.-S. Cheng, J. Benson, R. H. Pierce, J. Zaias, et al. 2003 "Recreational Exposure to Aerosolized Brevetoxins During Florida Red Tide Events." *Harmful Algae* 2 (1) : 19-28. [https://doi.org/10.1016/S1568-9883\(03\)00005-2](https://doi.org/10.1016/S1568-9883(03)00005-2)
- Backer, L. C., B. Kirkpatrick, L. E. Fleming, Y. S. Cheng, R. Pierce, J. A. Bean, R. Clark, et al. 2005 "Occupational Exposure to Aerosolized Brevetoxins During Florida Red Tide Events: Effects on a Healthy Worker Population." [In eng]. *Environmental health perspectives* 113 (5): 644-649. <https://dx.doi.org/10.1289%2Fehp.7502>
- Baden, D. G. 1983 "Marine Food-Borne Dinoflagellate Toxins." [In eng]. *International Review of Cytology* 82: 99-150. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)60824-4](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)60824-4)
- Baden, D. G., et T. J. Mende. 1982. "Toxicity of Two Toxins from the Florida Red Tide Marine Dinoflagellate, *Ptychodiscus Brevis*." [In eng]. *Toxicon* 20 (2) : 457-461. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(82\)90009-5](https://doi.org/10.1016/0041-0101(82)90009-5)
- Baden, D; G, et C. R. Tomas. 1988. "Variations in Major Toxin Composition for Six Clones of *Ptychodiscus Brevis*." *Toxicon* 26 (10) : 961-963. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(88\)90261-9](https://doi.org/10.1016/0041-0101(88)90261-9)
- Baden, D., A. Bourdelais, H. Jacocks, S. Micelliza, J Naar 2005. "Natural and Derivative Brevetoxins: Historical Background, Multiplicity, and Effects ". *Environmental Health Perspectives* 113 (5): 621-625.
- Baden, D. G., T. J. Mende, G. Bikhazi, et I. Leung 1982. "Bronchoconstriction Caused by Florida Red Tide Toxins." *Toxicon* 20 (5) : 929-932. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(82\)90081-2](https://doi.org/10.1016/0041-0101(82)90081-2).
- Bean, J.A., L. E. Fleming, B. Kirkpatrick, L. C. Backer, K. Nierenberg, A. Reich, Y. S. Cheng, et al. 2011. "Florida Red Tide Toxins (Brevetoxins) and Longitudinal Respiratory Effects in Asthmatics." [In eng]. *Harmful algae* 10 (6): 744-748. <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.hal.2011.06.008>

- Benson, J. M., D. L. Tischler et D. G. Baden. 1999. "Uptake, tissue distribution, and excretion of brevetoxin 3 administered to rats by intratracheal instillation." *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A* 57 (5): 345-355. <https://doi.org/10.1080/009841099157656>
- Benson, J. M., F. F. Hahn, T. H. March, J. D. McDonald, A. P. Gomez, M. J. Sopori, A. J. Bourdelais, et al. 2005. "Inhalation Toxicity of Brevetoxin 3 in Rats Exposed for Twenty-Two Days." [In eng]. *Environmental Health Perspectives* 113 (5): 626-631. <https://doi.org/10.1289/ehp.7497>
- Benson, J. M., F. F. Hahn, T. H. March, J. D. McDonald, M. L. Sopori, J. Seagrave, A. P. Gomez, et al. 2004. "Inhalation Toxicity of Brevetoxin 3 in Rats Exposed for 5 Days." [In English]. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A* 67 (18) : 1443-1456. <https://doi.org/10.1289/ehp.7497>
- Benson, J. M., F. F. Hahn, B. M. Tibbetts, L. E. Bowen, T. F. March, R. J. Langley, T. F. Murray, et al. (2004). "Florida Red Tide: Inhalation Toxicity of *Karenia Brevis* Extract in Rats." [In eng]. *Harmful algae 2002 : proceedings of the Xth International Conference on Harmful Algae, St. Pete Beach, Florida, USA, October 21-25, 2002. International Conference on Harmful Algae (10th : 2002 : St. Pete Beach, Florida)* 10: 502-504.
- Benson, J. M., B. B. Stagner, G. K. Martin, M. Friedman, S. E. Durr, A. Gomez, J. McDonald, et al. 2005. "Cochlear Function in Mice Following Inhalation of Brevetoxin-3." [In eng]. *The Journal of Comparative Physiology A* 191 (7) : 619-626. doi: 10.1007/s00359-005-0613-0.
- Benson, J. M., M. L. Wolf, A. Kajon, B. M. Tibbetts, A. J. Bourdelais, D. G. Baden, and T. H. March. 2011. "Brevetoxin Inhalation Alters the Pulmonary Response to Influenza a in the Male F344 Rat." [In eng]. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 74 (5): 313-324. <https://doi.org/10.1080/15287394.2010.519316>;
- Benson, J. M., A. P. Gomez, G. L. Statom, B. M. Tibbetts, L. E. Fleming, L. C. Backer, A. Reich, et D. G. Baden. 2006. "Placental Transport of Brevetoxin-3 in Cd-1 Mice." [In eng]. *Toxicol : official journal of the International Society on Toxinology* 48 (8) : 1018-1026. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2006.08.008>
- Blanchard, D. C. 1989. "The Ejection of Drops from the Sea and Their Enrichment with Bacteria and Other Materials: A Review." *Estuaries* 12 (3): 127-137. <https://doi.org/10.2307/1351816>.
- Blanchard, D. C., et A. H. Woodcock. 1980 "The Production, Concentration, and Vertical Distribution of the Sea-Salt Aerosol." *Annals of the New York Academy of Sciences* 338 (1): 330-347. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1980.tb17130.x>
- Bossart, G. D., D. G. Baden, R. Y. Ewing, B. Roberts, and S. D. Wright. 1998. "Brevetoxicosis in Manatees (*Trichechus Manatus Latirostris*) from the 1996 Epizootic: Gross, Histologic, and Immunohistochemical Features." [In eng]. *Toxicol Pathol* 26 (2) : 276-282. <https://doi.org/10.1177/019262339802600214>
- Botes, L., A. J. Smit, et P. A. Cook. 2003. "The Potential Threat of Algal Blooms to the Abalone (*Haliotis Midiae*) Mariculture Industry Situated around the South African Coast." [In English]. *Harmful Algae* 2 (4): 247-259. [https://doi.org/10.1016/S1568-9883\(03\)00044-1](https://doi.org/10.1016/S1568-9883(03)00044-1)
- Bourdelais, A. J., H. M. Jacocks, J. L. C. Wright, P. M. Bigwarfe Jr, et D. G. Baden. 2005 "A New Polyether Ladder Compound Produced by the Dinoflagellate *Karenia Brevis*." *Journal of Natural Products* 68 (1) : 2-6. <https://doi.org/10.1021/np049797o>
- Bourdelais, A. J., C. R. Tomas, J. Naar, J. Kubanek, and D. G. Baden. 2002. "New Fish-Killing Alga in Coastal Delaware Produces Neurotoxins." [In English]. *Environmental Health Perspectives* 110 (5): 465-470. <https://dx.doi.org/10.1289%2Fehp.02110465>.
- Brand, L. E., et A. Compton. 2007. "Long-Term Increase in *Karenia Brevis* Abundance Along the Southwest Florida Coast." [In eng]. *Harmful Algae* 6 (2) : 232-252. <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.hal.2006.08.005>
- Burke, W. A., et P. A. Tester. (2002). "Skin Problems Related to Noninfectious Coastal Microorganisms." *Dermatologic Therapy* 15 (1): 10-17. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8019.2002.01507.x>
- Buttke, D. E., A. Walker, I. S. Huang, L. Flewelling, J. Lankton, A. E. Ballmann, T. Clapp, J. Lindsay, et P. V. Zimba 2018. "Green Tree Frog (*Hyla Cinerea*) and Ground Squirrel (*Xerospermophilus Spilosoma*) Mortality Attributed to Inland Brevetoxin Transport at Padre Island National Seashore, Texas, USA, 2015." [In English]. *Journal of Wildlife Diseases* 54(1): 142-146. <https://doi.org/10.7589/2017-01-018>

- Callaghan, A. H., G. B. Deane, M. Dale Stokes, et B. Ward. 2012. "Observed Variation in the Decay Time of Oceanic Whitecap Foam." *Journal of Geophysical Research: Oceans* 117, no. C9. <https://doi.org/10.1029/2012JC008147>
- Castle, K. T., L. J. Flewelling, J. Bryan, 2nd, A. Kramer, J. Lindsay, C. Nevada, W. Stablein, D. Wong, et J. H. Landsberg. 2013. "Coyote (*Canis Latrans*) and Domestic Dog (*Canis Familiaris*) Mortality and Morbidity Due to a *Karenia Brevis* Red Tide in the Gulf of Mexico." *Journal of Wildlife Disease* 49 (4) : 955-964. <https://doi.org/10.7589/2012-11-299>.
- Cheng Y.S., T.A. Villareal Y. Zhou, J. Gao, R.H. Pierce, J. Naar, D.G. Baden. (2004). "Characterization of Red tide aerosol on the Texas coast." *Harmful Algae 2005 St. Petersburg FL: Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, Florida Institute of Oceanography, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO*. L. J. Steidinger KA, Tomas CR, Vargo GA: 499-501.
- Cheng, Y. S., J. D. McDonald, D. Kracko, C.M. Irvin , Y. Zhou, R. H. Pierce, M. S. Henry, et al. 2005a. "Concentration and Particle Size of Airborne Toxic Algae (Brevetoxin) Derived from Ocean Red Tide Events." [In eng]. *Environmental science & technology* 39 (10): 3443-3449. <https://dx.doi.org/10.1021%2Fes048680j>
- Cheng, Y. S., Y. Zhou, C.M. Irvin., R. H. Pierce, J. Naar, L. C. Backer, L. E. Fleming, Barbara Kirkpatrick, and Dan G. Baden. 2005b. "Characterization of Marine Aerosol for Assessment of Human Exposure to Brevetoxins." [In eng]. *Environmental health perspectives* 113 (5): 638-643. <https://dx.doi.org/10.1289%2Fehp.7496>
- Cheng, Y. S., Y. Zhou, R. H. Pierce, M. Henry, et D. G. Baden. 2010. "Characterization of Florida Red Tide Aerosol and the Temporal Profile of Aerosol Concentration." [In eng]. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 55 (5): 922-929. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.10.016>
- Claeys, M. 2016. "Modelisation Des Aerosols Marins Et De Leur Impact Radiatif Direct Sur Le Bassin Mediterranéen Dans Le Cadre Du Projet Charmex." Thèse d'université. Institut National Polytechnique de Toulouse
- Cocilova, C. C., L. J. Flewelling, G. D. Bossart, A. A. Granholm, et S. L. Milton. 2017. "Tissue Uptake, Distribution and Excretion of Brevetoxin-3 after Oral and Intratracheal Exposure in the Freshwater Turtle *Trachemys Scripta* and the Diamondback Terrapin *Malaclemys Terrapin*." [In eng]. *Aquat Toxicol* 187: 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.03.003>
- Cummins, J. M., A. C. Jones, et A. A. Stevens. 1971. "Occurrence of Toxic Bivalve Molluscs During a *Gymnodinium Breve* "Red Tide". " *Transactions of the American Fisheries Society* 100 (1): 112-116. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1971\)100%3C112:OOTBMD%3E2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1971)100%3C112:OOTBMD%3E2.0.CO;2)
- Demoisson, A. 2014. "Study of the Source and the Transport of Sea-Spays in the Mediterranean Coastal Zone" Université de Toulon, <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01314438>.
- Doucette, G. J., M. M. Logan, J. S. Ramsdell, et F. M. Van Dolah. 1997. "Development and Preliminary Validation of a Microtiter Plate-Based Receptor Binding Assay for Paralytic Shellfish Poisoning Toxins." [In eng]. *Toxicon* 35 (5): 625-636.
- Doucette, G. J. 1995. "Interactions between Bacteria and Harmful Algae: A Review." *Natural toxins* 3 (2): 65-74. <https://doi.org/10.1002/nt.2620030202>
- Ferrante M., G. O. Conti, M. Fiore, V. Rapisarda, C. Ledda. 2013. "Harmful Algal Blooms in the Mediterranean Sea: Effects on Human Health." *EuroMediterranean Biomedical Journal* 8 (6): 25-34. <http://dx.doi.org/10.3269/1970-5492.2013.8.6>
- Fleming, L. E., L. C. Backer, and D. G. Baden. 2005. "Overview of Aerosolized Florida Red Tide Toxins: Exposures and Effects." [In English]. *Environmental Health Perspectives* 113 (5): 618-620. <https://dx.doi.org/10.1289%2Fehp.7501>
- Fleming, L. E., J. A. Bean, B. Kirkpatrick, Y. S. Cheng, R. Pierce, J. Naar, K. Nierenberg, et al. 2009 "Exposure and Effect Assessment of Aerosolized Red Tide Toxins (Brevetoxins) and Asthma." [In eng]. *Environmental health perspectives* 117(7): 1095-1100. <https://dx.doi.org/10.1289%2Fehp.0900673>
- Fleming, L. E., B. Kirkpatrick, L. C. Backer, J. A. Bean, A. Wanner, A. Reich, J. Zaias, et al. 2007 "Aerosolized Red-Tide Toxins (Brevetoxins) and Asthma." [In eng]. *Chest* 131 (1): 187-194. <https://doi.org/10.1378/chest.06-1830>

- Flewelling, L. J., J. P. Naar, J. P. Abbott, D. G. Baden, N. B. Barros, G. D. Bossart, M.-Y. D. Bottein, *et al.* 2005. "Brevetoxicosis: Red Tides and Marine Mammal Mortalities." [In eng]. *Nature* 435 (7043): 755-756.
- Gong, S. L., L. A. Barrie, et J.-P. Blanchet. 1997. "Modeling Sea-Salt Aerosols in the Atmosphere: 1. Model Development." *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* 102 (D3): 3805-3818. <https://doi.org/10.1029/96JD02953>
- Hardman, R. C., W. J. Cooper, A. J. Bourdelais, P. Gardinali, et D. G. Baden. "Brevetoxin Degradation and by-Product Formation Via Natural Sunlight." [In eng]. (2004). *Harmful algae 2002 : proceedings of the Xth International Conference on Harmful Algae, St. Pete Beach, Florida, USA, October 21-25, 2002. International Conference on Harmful Algae (10th : 2002 : St. Pete Beach, Florida)* 10: 153-154.
- Heisler, J., P. Glibert, J. Burkholder, D. Anderson, W. Cochlan, W. Dennison, C. Gobler, *et al.* 2008. "Eutrophication and Harmful Algal Blooms: A Scientific Consensus." [In eng]. *Harmful algae* 8 (1): 3-13. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.08.006>
- Hemmer, W. H. 1975. The public health implications of *Gymnodinium breve* red tides, a review of literature and recent events. In: LoCicero, V. R. (Ed.). Proceedings of the First International Conference on Toxic Dinoflagellate Blooms, Wakefield, Massachusetts Science and Technology Foundation. pp. 489-497.
- Hoagland, P., D. M. Anderson, Y. Kaoru, et A. W. White. 2002. "The Economic Effects of Harmful Algal Blooms in the United States: Estimates, Assessment Issues, and Information Needs." *Estuaries* 25, (4): 819-837. <https://doi.org/10.1007/BF02804908>
- Hoagland, P., D. Jin, L. Y. Polansky, B. Kirkpatrick, G. Kirkpatrick, L. E. Fleming, A. Reich, *et al.* 2009. "The Costs of Respiratory Illnesses Arising from Florida Gulf Coast *Karenia Brevis* Blooms." *Environmental Health Perspectives* 117 (8): 1239-1243. <https://dx.doi.org/10.1289%2Fehp.0900645>
- Horner, R. A., D. L. Garrison, et F. G. Plumley. 1997. "Harmful Algal Blooms and Red Tide Problems on the U.S. West Coast." [In English]. *Limnology and Oceanography* 42, (5) II: 1076-1088. https://doi.org/10.4319/lo.1997.42.5_part_2.1076
- Khan, U., N. Benabderrazik, A. J. Bourdelais, D. G. Baden, K. Rein, P. R. Gardinali, L. Arroyo, et Kevin E. O'Shea. 2010 "Uv and Solar TiO₂ Photocatalysis of Brevetoxins (Pbtxs)." *Toxicon* 55 (5): 1008-1016. <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.toxicon.2009.11.014>
- Kieber, R. J., J. Pitt, S. A. Skrabal, et J. L. C. Wright. 2010. "Photodegradation of the Brevetoxin Pbtx-2 in Coastal Seawater." *Limnology and Oceanography* 55 (6): 2299-2304. <https://doi.org/10.4319/lo.2010.55.6.2299>
- Kirkpatrick, B., J. Bean, L. E Fleming, L. C. Backer, R. Akers, A. Wanner, D. Dalpra, *et al.* 2009. "Aerosolized Red Tide Toxins (Brevetoxins) and Asthma: A 10 Day Follow up after 1 Hour Acute Beach Exposure." Paper presented at the Proceedings of the 12th International Conference on Harmful Algae.
- Kirkpatrick, B., L. E. Fleming, J. A. Bean, K. Nierenberg, L. C. Backer, Y. S. Cheng, R. Pierce, *et al.* (2011) "Aerosolized Red Tide Toxins (Brevetoxins) and Asthma: Continued Health Effects after 1 Hour Beach Exposure." [In eng]. *Harmful algae* 10 (2) : 138-143. <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.hal.2010.08.005>
- Kirkpatrick, B., L. E. Fleming, L. C. Backer, J. A. Bean, R. Tamer, G. Kirkpatrick, T. Kane, A. Wanner, D. Dalpra, A; Reich, et D; G. Badenh 2006. "Environmental exposures to Florida red tides: Effects on emergency room respiratory diagnoses admissions." *Harmful Algae* 5(5): 526-533.
- Kirkpatrick, B., L. E. Fleming, D. Squicciarini, L. C. Backer, R. Clark, W. Abraham, J. Benson, *et al.* 2004 "Literature Review of Florida Red Tide: Implications for Human Health Effects." [In eng]. *Harmful algae* 3 (2): 99-115. <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.hal.2003.08.005>
- Kirkpatrick, B., R. Pierce, Y. S. Cheng, M. S. Henry, P. Blum, S. Osborn, K. Nierenberg, *et al.* 2010 "Inland Transport of Aerosolized Florida Red Tide Toxins." [In eng]. *Harmful algae* 9 (2): 186-189. <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.hal.2009.09.003>
- Kusek K.M., Vargo G., et K. Steidinger. 1999 "Gymnodinium Breve in the Field, in the Lab, and in the Newspaper - a Scientific and Journalistic Analysis of Florida Red Tides." *Contributions in Marine Science* 34: 1-228.

- Lamberto J.N., Bourdelais A., Jacocks H.M., Tomas C., Baden D.G. 2004. "Effects of Temperature on Production of Brevetoxin and Brevetoxin-Like Compounds." In *Harmful Algae 2002 . St. Petersburg Fl: Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, Florida Institute of Oceanography, Intergovernmental Oceanographic Commission of Unesco; 2004.* , edited by Landsberg JH Steidinger KA, Tomas CR, Vargo GA, , 155-56, 2004.
- Landsberg, J. H. 2002 "The Effects of Harmful Algal Blooms on Aquatic Organisms." *Reviews in Fisheries Science* 10 (2) : 113-390. <https://doi.org/10.1080/20026491051695>
- Lewandowska, A. U., S. Śliwińska-Wilczewska, et D. Woźniczka. 2017 "Identification of Cyanobacteria and Microalgae in Aerosols of Various Sizes in the Air over the Southern Baltic Sea." *Marine Pollution Bulletin* 125 (1): 30-38. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.07.064>
- Lewis E. R. et Schwartz S. 2004. "Sea Salt Aerosol Production: Mechanisms, Methods, Measurements, and Models -- a Critical Review." *Geophysical Monograph* 152 : 3719. <http://dx.doi.org/10.1029/GM152>.
- Milian, A., K. Nierenberg, L. E. Fleming, J. A. Bean, A. Wanner, A. Reich, L. C. Backer, D. Jayroe, and B. Kirkpatrick. 2007. "Reported Respiratory Symptom Intensity in Asthmatics During Exposure to Aerosolized Florida Red Tide Toxins." [In English]. *Journal of Asthma* 44 (7) : 583-587. <https://doi.org/10.1080/02770900701539251>
- Monahan, E. C., D. E. SpielK., L. Davidson 1986. "A Model of Marine Aerosol Generation Via Whitecaps and Wave Disruption. Oceanic Whitecaps: And Their Role in Air-Sea Exchange Processes. E. C. Monahan and G. M. Niocaill. Dordrecht, Springer Netherlands: 167-174.
- Music, S. I., J. T. Howell, et C. L. Brumback. 1973. "Red Tide. Its Public Health Implications." [In eng]. *Jfma* 60 (11) : 27-29.
- Nierenberg, K., K. Kirner, P. Hoagland, S. Ullmann, W. G Leblanc, G. Kirkpatrick, L. E Fleming, B.Kirkpatrick 2010. "Changes in work habits of lifeguards in relation to Florida red tide." *Harmful Algae* 9(4): 419-425.
- Patel, S. S., V. J. Lovko, and R. F. Lockey. 2020 "Red Tide: Overview and Clinical Manifestations." *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* 8 (4) : 1219-1223. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2019.10.030>
- Park S.-C., J.-K. Lee, S. W. Kim, et Y. Park. 2011 "Selective Algicidal Action of Peptides against Harmful Algal Bloom Species." *PLOS ONE* . <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026733>
- Piard R. 2013. "Toward the synthesis of Prodigiosin's analogous. Synthesis of asymmetric 2,2'-bipyrroles". (Vers la synthèse d'analogues de la Prodigiosine. Synthèse de 2,2'-bipyrroles dissymétriques). Université de Grenoble. ([NNT : 2013GRENV042](#))
- Pierce, R. H., et M. S. Henry. 2008. "Harmful Algal Toxins of the Florida Red Tide (*Karenia Brevis*): Natural Chemical Stressors in South Florida Coastal Ecosystems." *Ecotoxicology* 17 (7) : 623-631. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0241-x>
- Pierce, R. H., M.S. Henry, P.C. Blum, S.L. Hamel, B. Kirkpatrick, Y.S. Cheng, Y. Zhou, C.M. Irvin, J. Naar, A. Weidner, L.E. Fleming, L.C. Backer, D.G. Baden, 2005. "Brevetoxin composition in water and marine aerosol along a Florida beach: Assessing potential human exposure to marine biotoxins." *Harmful Algae* 4(6): 965-972. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2004.11.004>
- Pierce, R. H., M. S. Henry, P. C. Blum, J. Lyons, Y. S. Cheng, D. Yazzie, and Y. Zhou. 2003 "Brevetoxin Concentrations in Marine Aerosol: Human Exposure Levels During a *Karenia Brevis* Harmful Algal Bloom." [In eng]. *Bull Environ Contam Toxicol* 70 (1): 161-165. <https://dx.doi.org/10.1007%2Fs00128-002-0170-y>
- Pierce, R.H., M. Henry, P. Blum, et S. Payne. 2000 "*Gymnodinium Breve* Toxins without Cells: Intra-Cellular and Extra-Cellular Toxins." *Harmful algal blooms* : 421-424.
- Pierce, RH, M Henry, S Boggess, and A Rule. 1989 "Climate and Health Implications of Bubble-Mediated Sea-Air Exchange.")._Connecticut Sea Grant College Program (January 1, 1989)
- Pierce, R. H. 1986 "Red Tide (*Ptychodiscus Brevis*) Toxin Aerosols: A Review." *Toxicon* 24, (10) : 955-965. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(86\)90001-2](https://doi.org/10.1016/0041-0101(86)90001-2)
- Pierce, R. H., M. S. Henry, P. C. Blum, S. E. Osborn, Y.-S. Cheng, Y. Zhou, C. M. Irvin, et al. 2011"Compositional Changes in Neurotoxins and Their Oxidative Derivatives from the Dinoflagellate, *Karenia Brevis*, in Seawater and Marine Aerosol." [In eng]. *Journal of plankton research* 33, no. 2 (2011): 343-48. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbq115>

- Pierce, R.H., M. S. Henry, C.J. Higham, P. Blum, M. R. Sengco, and D. M. Anderson. 2004 "Removal of Harmful Algal Cells (*Karenia Brevis*) and Toxins from Seawater Culture by Clay Flocculation." *Harmful Algae* 3 (2): 141-148. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2003.09.003>
- Quinn, P. K., D. B. Collins, V. H. Grassian, K. A. Prather, et T. S. Bates. 2015. "Chemistry and Related Properties of Freshly Emitted Sea Spray Aerosol." *Chemical Reviews* 115 (10) : 4383-4399. <https://doi.org/10.1021/cr500713g>
- Quirino W, Fleming LE, Weisman R, Backer L, Kirkpatrick B, Clark R, Dalpra D, Van de Bogart G, Gaines M. 2004. "Follow up study of red tide associated respiratory illness". *Fl J Env Health.*;186:18–22
- Ramsdell, J. S. 2008 "The Molecular and Integrative Basis to Brevetoxin Toxicity." In *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection, Second Edition*, 519-50,. <http://dx.doi.org/10.1201/9781420007541.ch24>
- Rhodes, L. L., A. L., Mackenzie , H. F. Kaspar, K. E. , Todd 2001. "Harmful algae and mariculture in New Zealand. – *ICES Journal of Marine Science*, 58: 398–403. doi:10.1006/jmsc.2000.102
- Roszell L.E., Schulman L.S., Baden D.G. 1989 "Toxin Profiles Are dependent on Growth Stages in Cultured *Ptychodiscus brevis*." In *Toxic Marine Phytoplankton* edited by Sunstrom B Granelli E, Edler L, Anderson D , 403-406.
- Keith R. Schneider, Richard H. Pierce, Gary E. Rodrick, 2003 "The degradation of *Karenia brevis* toxins utilizing ozonated seawater," *Harmful Algae*, 2 (2) : 101-107. ISSN 1568-9883.
- Sengco, M. R., et D. M. Anderson. 2004 "Controlling Harmful Algal Blooms through Clay Flocculation." [In eng]. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 51, no. 2: 169-72.
- Sengco, M. R. 2009. "Prevention and Control of *Karenia Brevis* Blooms." *Harmful Algae* 8 (4) : 623-628. <http://dx.doi.org/10.1016/j.hal.2008.11.005>
- Steidinger, K.A., Baden, D.G.,. 1984 "Toxic Marine Dinoflagellates." In *Dinoflagellates.*, edited by D.L. (Ed.) Spector, 201–61.
- Tester, P. A., D. Shea, S. R. Kibler, S. M. Varnam, M. D. Black, et R. W. Litaker. 2008 "Relationships among Water Column Toxins, Cell Abundance and Chlorophyll Concentrations During *Karenia Brevis* Blooms." *Continental Shelf Research* 28 (1): 59-72. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2007.04.007>
- Tester, P. A., et K. A. Steidinger. 1997 "Gymnodinium Breve Red Tide Blooms: Initiation, Transport, and Consequences of Surface Circulation." *Limnology and Oceanography* 42, (5) part2: 1039-1051. http://dx.doi.org/10.4319/lo.1997.42.5_part_2.1039
- Thorpe, S. A., P. Bowyer, et D. K. Woolf. 1982 "Some Factors Affecting the Size Distributions of Oceanic Bubbles." [In English]. *Journal of Physical Oceanography* 22 (4): 382-389. [https://doi.org/10.1175/1520-0485\(1992\)022<0382:SFATSD>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1175/1520-0485(1992)022<0382:SFATSD>2.0.CO;2)
- Tibbetts, B. M., D. G. Baden, et J. M. Benson. 2006 "Uptake, Tissue Distribution, and Excretion of Brevetoxin-3 Administered to Mice by Intratracheal Instillation." [In eng]. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 69(14): 1325-1335. <https://doi.org/10.1080/15287390500360091>
- Turner, A. D., C. Higgins, K. Davidson, A. Veszelszki, D. Payne, J. Hungerford, et W. Higman. 2015 "Potential Threats Posed by New or Emerging Marine Biotoxins in Uk Waters and Examination of Detection Methodology Used in Their Control: Brevetoxins." *Marine drugs* 13(3) : 1224-1254. <https://doi.org/10.3390/md13031224>.
- Varlas, G., E. Marinou, A. Gialitaki, N. Siomos, K. Tsarpalis, N. Kalivitis, S. Solomos, et al. 2021 "Assessing Sea-State Effects on Sea-Salt Aerosol Modeling in the Lower Atmosphere Using Lidar and in-Situ Measurements." *Remote Sensing* 13 (4): 614. <https://doi.org/10.3390/rs13040614>
- Woodcock, A. 1948 "Note Concerning Human Respiratory Irritation Associated with High Concentrations of Plankton and Mass Mortality of Marine Organisms." *Journal of Marine Research* 7 (56) .
- Yan, X., J. M. Benson, A. P. Gomez, D. G. Baden, et T. F. Murray. 2006 "Brevetoxin-Induced Neural Insult in the Retrosplenial Cortex of Mouse Brain." [In eng]. *Inhalation Toxicology* 18 (14) : 1109-1116. <https://doi.org/10.1080/08958370600945804>

- Zaias, J, L.C. Backer, et L.E. Fleming. 2010. "Harmful Algal Blooms (Habs) In: Rabinowitz P, Conti L, Editors. Human-Animal Medicine: A Clinical Guide to Toxins, Zoonoses, and Other Shared Health Risks." New York: Elsevier Science Publishers.
- Zaias, J., L. E. Fleming, D. G. Baden, et W. M. Abraham. 2011 "Repeated Exposure to Aerosolized Brevetoxin-3 Induces Prolonged Airway Hyperresponsiveness and Lung Inflammation in Sheep." [In English]. *Inhalation Toxicology* 23 (4) : 205-211. <https://doi.org/10.3109/08958378.2011.558936>
- Zhang, S., W. Zheng, and H. Wang. 2020 "Physiological Response and Morphological Changes of *Heterosigma Akashiwo* to an Algicidal Compound Prodigiosin." *Journal of Hazardous Materials* 385 : 121530. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121530>

ANNEXES

Annexe 1 : Lettre de saisine

2020-SA-0020



COURRIER ARRIVE

30 JAN. 2020

DIRECTION GENERALE

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE
L'ALIMENTATION

Direction Générale de l'alimentation

Service de l'Alimentation

Sous-direction de la Sécurité Sanitaire des
Aliments

Bureau des produits de la mer et d'eau douce

251 rue de Vaugirard
75732 Paris cedex 15

Dossier suivi par : Mathilde PALUSSIÈRE
Tél. : 01 49 55 60 44
Mél : bpmmed.sdssa.dgal@agriculture.gouv.fr

MINISTÈRE DES SOLIDARITÉS ET DE LA SANTÉ

Direction Générale de la santé

Sous-direction de la prévention des risques liés à
l'environnement et à l'alimentation

Bureau de l'alimentation et de la nutrition

14, avenue Duquesne
75350 Paris 07 SP

Dossier suivi par : Mélanie PICHEROT
Tél. : 01 40 56 54 24
Mél : melanie.picherot@sante.gouv.fr

Réf. : SDSSA/BPMED/19-140

N° - 0019

Le Directeur Général de l'Alimentation
et

Le Directeur Général de la Santé

à

Monsieur le Directeur Général

de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

4 rue Pierre et Marie Curie
94701 Maisons-Alfort Cedex

Paris, le

14 JAN. 2020

Objet : demande d'avis de l'Anses quant à la toxicité aiguë et chronique des brevétoxines susceptibles d'exposer le consommateur à un risque par ingestion, par inhalation ou par contact

Conformément à l'article R. 1313-1 du code de la santé publique, nous sollicitons l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail pour réaliser une expertise relative à la toxicité aiguë et chronique des brevétoxines produites par des microalgues marines et susceptibles d'exposer le consommateur à un risque sanitaire par ingestion de coquillages contaminés, d'exposer le baigneur ou toute personne pratiquant une activité nautique à un risque sanitaire par contact avec de l'eau contaminée ou d'exposer un individu à un risque sanitaire par inhalation d'embruns.

1/3

Les brevétoxines (BTX) comprennent de nombreux composés produits par le dinoflagellé *Karenia brevis*. Elles peuvent s'accumuler dans la chaîne alimentaire, notamment dans les coquillages, sur lesquels elles n'ont pas d'effet. Elles sont toxiques pour certains animaux : elles peuvent provoquer des mortalités massives de poissons, d'oiseaux et de mammifères marins.

Les BTX sont responsables chez l'humain d'un syndrome NSP (neurotoxic shellfish poisoning). Les symptômes commencent 15 minutes à 3 heures après ingestion de coquillages et persistent généralement pendant quelques heures. Ils sont à la fois nerveux et gastro-intestinaux. Cette intoxication n'est pas fatale, mais certains cas nécessitent une hospitalisation. Des symptômes peuvent également apparaître à la suite d'une exposition à des aérosols ou à de l'eau contaminée, en cas de bloom important : ils sont alors respiratoires et oculaires (irritation) et régressent en quittant la zone contaminée. Hormis les patients ayant des problèmes respiratoires préalables, la récupération est complète et rapide.

Des épidémies liées à la présence de BTX ont eu lieu en Nouvelle-Zélande, en Australie, au Japon, dans le golfe du Mexique et le long de la côte atlantique des USA. Aucun cas n'a été recensé en Europe, mais des *Karenia* sont présentes dans les eaux européennes.

En France, de nombreuses toxines non réglementées sont suivies dans le cadre du dispositif de veille d'émergence des biotoxines marines (EMERGTOX). Les BTX sont incluses dans ce dispositif depuis début 2018. Elles ont été mises en évidence en Corse en novembre 2018 dans des moules (117 µg/kg de glande digestive), simultanément à la présence de *Karenia spp.*

La FAO en 2004 n'a pas pu établir d'ARfD¹ orale, tout comme l'EFSA dans son évaluation de 2010².

S'il n'existe pas de limite officielle en Europe, les USA³, le Mexique⁴ et la Nouvelle-Zélande⁵ ont défini un seuil à 800 µg d'eq. BTX2 / kg de chair de coquillages.

Dans ce contexte, je souhaite que l'Agence puisse répondre aux questions suivantes :

1. Quelles sont les données toxicologiques disponibles pour les brevétoxines ? Permettent-elles à l'Anses de proposer des valeurs toxicologiques de référence aiguë et chronique par voie orale ?
2. Sur la base des données toxicologiques identifiées par l'Anses, est-il possible de proposer une valeur guide dans les coquillages au-delà de laquelle des investigations complémentaires seraient demandées dans le cadre du dispositif EMERGTOX ?
3. Quelles modalités de suivi des brevétoxines dans le milieu marin pourraient être recommandées dans le cadre du dispositif EMERGTOX ? Quelles investigations complémentaires seraient à réaliser en cas de dépassement de la valeur guide ?

¹ Acute Reference Dose, ou dose de référence aiguë

² Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Emerging toxins: Brevetoxin group, EFSA Panel on contaminants in the Food Chain (CONTAM), EFSA Journal 2010; 8(7):1677.

³ Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance, Fourth Edition – August 2019, Appendix 5: FDA and EPA safety levels in regulations and guidance, FDA
<https://www.fda.gov/media/80400/download>

⁴ NOM-031-SSA1-1993: Especificaciones sanitarias de los moluscos bivalvos frescos-refrigerados y congelados.

http://www.fao.org/fishery/shared/faolextrans.jsp?xp_FAOLEX=LEX-FAOC013357&xp_faoLexLang=E&xp_lang=en

⁵ Animal Products Notice: Regulated Control Scheme - Bivalve Molluscan Shellfish for Human Consumption, 2 August 2018, Ministry for Primary Industries
<https://www.mpi.govt.nz/dmsdocument/30282-animal-products-notice-regulated-control-scheme-bivalve-molluscan-shellfish-for-human-consumption-2018>

4. Compte tenu des données toxicologiques, et au vu du contexte, existe-t-il une préoccupation de santé publique aux niveaux de contaminations identifiés dans certaines zones marines françaises liée à la consommation de coquillages ?

5. Existe-t-il une préoccupation sanitaire liée à l'exposition aux brevétoxines par un contact direct avec de l'eau contaminée notamment en cas de baignade ou de pratique d'activités nautiques ou en cas d'exposition par inhalation à des embruns ?

Une réponse de votre part pour les questions 1 à 4 est souhaitée sous 10 mois. La question 5 n'ayant pas été prévue au programme de travail 2020 de l'Anses pourra être traitée dans un second temps.



Le Directeur Général de l'Alimentation
Bruno FERREIRA



Le Directeur Général de la Santé,
Professeur Jérôme SALOMON

Annexe 2 : Sélection des articles

Revue systématique	Données bibliographiques relative à la toxicité aiguë et chronique des BTX
Reference saisine Anses	2020-SA-0020
Thèmes	ADME /Toxicité humaine / <i>in vivo</i> / <i>in vitro</i>
Recherche n°1	
Base de données n°1	SCOPUS
Phrase de recherche	TITLE-ABS-KEY (Brevetoxin)
Date	14/05/2020
Nombre de références trouvées	853
Recherche n°2	
Base de données n°2	PUBMED
Phrase de recherche	"Brevetoxin"[All Fields]
Date	14/05/2020
Nombre de références trouvées	460
Elimination des références en double	
Nombre total de références (somme des bases de données)	1313
Nombre de références en double détectées par EndNote	338
Nombre de références sans les références en double détectées par EndNote	975
Références trouvées en double par le rédacteur	187
Nombre final sans les références en double	868
Date	14/05/2020 – mise à jour 19/02/2021
Première étape de sélection (titre et résumé)	
Nombre de références exclues car ne répondant pas aux critères d'inclusion	203
Toxine autre que les brevétoxines	67
Synthèse chimique de brevétoxines	76
Langue autre que français et anglais	7
Total (exclues)	353
Nombre de références retenues pour la 2nd étape de sélection	515
Ecotoxicité	86
Exposition	32
Génotoxicité	5

Méthodes analytiques et chimie	130		
Microalgue productrice de brevétoxines	44		
Surveillance	5		
Toxicité humaine	28		
Toxicité in vitro et récepteurs	121		
Toxicité in vivo et articles de revue	64		
Date	31/05/2020 – mise à jour 19/02/2021		
Seconde étape de sélection (articles en entier)			
Réunion du GT BTX du 15/07/2020	Incluses	Exclues	Ajoutées par les experts du GT BTX pendant l'expertise
Ecotoxicité	81	5	30
Exposition	32	0	0
Génotoxicité	4	1	16
Méthodes analytiques et chimie	95	35	37
Microalgue productrice de brevétoxines	36	8	68
Surveillance	5	0	19
Toxicité humaine	16	12	12
Toxicité in vitro et récepteurs	96	25	22
Toxicité in vivo et articles de revue	40	24	8
Nombre total de références (sans doublons) incluses dans l'analyse	603		

Critères d'inclusion lors des étapes de sélection des articles :

- Etudes sur les brevétoxines et composés assimilés
- ADME
- Toxicité chez l'Homme
- Toxicité *in vivo*
- Toxicité *in vitro*
- Données d'exposition

Critères d'exclusion :

- Toxine autre que les brevétoxines
- Article sur la synthèse chimique de brevétoxines
- Langue autre que français et anglais
- Articles non disponibles en entier

Critères d'inclusion pour faire l'objet d'une fiche détaillée de lecture :

- Etude de toxicité d'intérêt pour l'élaboration d'une valeur toxicologique de référence

Annexe 3 : Grilles de lecture des études clés identifiées par le GT

Auteurs, Année de la publication, Titre	Baden & Mende. 1982. Toxicity of two toxins from the Florida red tide marine dinoflagellate, <i>Ptychodiscus brevis</i> . <i>Toxicon</i> 20 (2), 457-461
Type d'étude	Toxicité aiguë
Respect BPL – lignes directrices	Non indiqué
Nom de la toxine	T17 (BTX-3) et T34 (BTX-2)
Substance test	Fractions purifiées et reconstituées (recristallisation) et considérées comme « homogènes » Our purification procedures have resulted in the preparation of two homogeneous lipid-soluble toxins from laboratory cultures of <i>P. brevis</i>. As previously reported, T34 is obtained in a crystalline state; yield 5.6 ± 0.7 mg/10⁹ cells (BADEN <i>et al.</i>, 1981). The further purification of T17 described in this report has resulted in the elimination of u.v.-absorbing non-toxic materials. A small amount of a material with a yellow color co-purifies with T17, but was separated when T17 was precipitated from ethanol solution by the addition of water. T17 is initially obtained as a fluffy white powder; yield 1.5 ± 0.3 mg/10⁹ cells. Recrystallization from ethanol/acetone solution produced T17 as colorless needles. Following crystallization, each toxin migrates uniformly in the thin-layer chromatographic systems listed in Table 1.
Pureté	Non indiquée
Espèce	Souris
Souche	Swiss
Sexe	Femelle
Age	Non indiqué
Poids	18-21 g
Nombre d'individus par groupe	5
Témoin	Groupe contrôle pour chaque voie d'administration (véhicule)
Concentrations en toxine	0,025 à 10.0 mg/kg en fonction de la voie d'administration – 6 concentrations testées
Volume	i.v : 0,1 ml ; volume non indiqué pour i.p et orale
Véhicule	i.v, i.p et orale : solution saline (0,9% NaCl)
Voie d'administration	i.v : veine caudale ; oral : gavage après anesthésie à l'éther ; i.p
Fréquence d'administration	1 administration (DL ₅₀)
Durée	24h

Autres traitements	Jeûne hydrique et alimentaire 16h avant expérimentation. Solution de glucose 20% pour minimiser stress et perte de poids														
Paramètres étudiés	DL50, symptômes, cinétique d'action														
Analyse statistique	DL50 avec intervalle de confiance (95%)														
Description de l'effet	<p>In mice T17 is more potent than T34, regardless of the route of administration (Table 2). T17 induced tremors, followed by marked muscular contractions or fasciculations, Straub tail phenomenon, a period of labored breathing and death. Mice injected with T17 exhibited the SLUD syndrome, i.e. salivation, lacrimation, urination and defecation (THAMPI et al., 1966) Hypersalivation was the most pronounced symptom, while copious urination and defecation were also common. Compulsory chewing motions and rhinorrhea were occasionally present at higher dosages. T34 intoxication was similar, although the chewing and hypersalivation were not expressed. Muscular fasciculation was present, but was less pronounced as compared to T17.</p> <p>Injection i.v. achieved rapid systemic distribution and produced immediate effects, whereas i.p. and oral administration was associated with latent (30 min and 5 hr respectively) response. With respect to the comparative lethality of each, several points are noteworthy. T17 is approximately 2-fold more potent by i.v. administration than by i.p. injection, implying that this agent is partially detoxified or excreted in the bile during the first passage through the liver. This apparently is not the case for T34, for which the i.v. and i.p. lethality are identical.</p>														
DL50	<p>TABLE 2. ACUTE LETHALITY OF T17 AND T34 BY DIFFERENT ROUTES OF ADMINISTRATION</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Route of administration</th> <th colspan="2">Acute 24 hr LD₅₀ (mg/kg)</th> </tr> <tr> <th>T17</th> <th>T34</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Intravenous</td> <td>0.094 (0.075–0.116)</td> <td>0.20 (0.17–0.25)</td> </tr> <tr> <td>Intraperitoneal</td> <td>0.17 (0.14–0.21)</td> <td>0.20 (0.15–0.27)</td> </tr> <tr> <td>Oral</td> <td>0.52 (0.37–0.73)</td> <td>6.6 (2.9–14.8)</td> </tr> </tbody> </table> <p>Results are shown as means (95% confidence limits).</p>	Route of administration	Acute 24 hr LD ₅₀ (mg/kg)		T17	T34	Intravenous	0.094 (0.075–0.116)	0.20 (0.17–0.25)	Intraperitoneal	0.17 (0.14–0.21)	0.20 (0.15–0.27)	Oral	0.52 (0.37–0.73)	6.6 (2.9–14.8)
Route of administration	Acute 24 hr LD ₅₀ (mg/kg)														
	T17	T34													
Intravenous	0.094 (0.075–0.116)	0.20 (0.17–0.25)													
Intraperitoneal	0.17 (0.14–0.21)	0.20 (0.15–0.27)													
Oral	0.52 (0.37–0.73)	6.6 (2.9–14.8)													
NOAEL/LOAEL	Aucune														
Qualité de l'étude	Satisfaisante (note ToxRTool de 15/21, Toxicological data Reliability assessment Tool, https://ec.europa.eu/jrc/en/scientific-tool/toxrtool-toxicological-data-reliability-assessment-tool)														
Commentaires	Compte-tenu de la date de réalisation de cette publication (1982), cette étude est assez satisfaisante. La limite tient dans la pureté de chacune des toxines, puisque le protocole retenu ne permet pas de quantifier le %. La cinétique d'action n'est pas indiquée précisément. Enfin, l'exposition par voie orale a été réalisée sous éther, ce qui constitue une limite à l'interprétation de symptômes neurotoxiques. Cependant, les autres voies d'exposition ne présentent pas cette limite.														
Etude à retenir pour l'expertise	Oui														
Date de relecture	15.11.2020														

Annexe 4 : Formation des aérosols

Les aérosols marins sont issus de l'interaction entre le vent et les vagues. L'écoulement du vent au-dessus de la mer est ralenti par la surface marine (Demoisson 2014). Les frottements engendrent de la turbulence mécanique à l'origine de la formation et du développement des vagues. Leur taille est déterminée par l'intensité et la durée du vent ainsi que par la distance sur laquelle il souffle, la topographie du fond de l'océan et la forme de la plage. Plus le vent est fort, plus l'action des vagues est grande. Lorsque la vitesse du vent est supérieure à $5 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$, des vagues sont formées à la surface des océans. Ces vagues grandissent puis déferlent. Quand une vague déferle, de l'air est entraîné sous la surface de l'eau (jusqu'à 10 m de profondeur) et forme, en remontant à la surface, un nuage de bulles (Demoisson 2014 ; Claeys 2016). Les aérosols marins sont générés en partie dans cette zone par un processus indirect « d'éclatement des bulles » ou sont directement arrachés par le vent aux crêtes des vagues (Figure 50) (Demoisson 2014).

Les bulles formées sont les premières responsables des émissions d'aérosols marins en éclatant à la surface (Figure 50) (Blanchard et Woodcock 1980 ; Demoisson 2014). Lorsqu'elles remontent à la surface, elles peuvent s'enrichir de matières, dissoutes ou particulières (Blanchard 1989). Les bulles chargées éclatent ensuite à la surface en produisant plusieurs centaines de gouttelettes de taille comprise entre le nanomètre et le micromètre (Quin *et al.* 2015). L'écume formée à la surface des océans est également génératrice d'aérosols dont la concentration en composés organiques, minéraux et microbiologiques est plus importante que dans les aérosols formés dans les vagues (Quin *et al.* 2015). Selon l'humidité relative, les aérosols restent soit sous forme de gouttes liquides, soit s'assèchent et deviennent des particules de sel marin (Blanchard 1989).

La quantité d'aérosol formé est négligeable quand la vitesse du vent est en dessous de $3 \text{ à } 4 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ (Blanchard 1989) mais lorsque les vents forçissent et passent sur une grande zone de déferlement (« surf zone »), ils peuvent capter autant d'aérosols que dans les ouragans (Blanchard, 1989). Les aérosols, en fonction de la taille des particules qui les composent, peuvent être transportés sur de longues distances et rester dans l'atmosphère pendant plusieurs jours voire plusieurs semaines (Gong *et al.* 1997 ; Demoisson 2014). Les plus grosses gouttelettes, émises par des vents forts ($> 9 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$), qui sont directement arrachées à la crête des vagues (Monahan *et al.* 1986) vont rester dans des zones plus proches de leurs zones d'émission. La salinité et la température de l'eau peuvent aussi influencer les émissions d'aérosols marins en raison de leurs effets sur la tension superficielle, la viscosité et la densité de l'eau (Thorpe *et al.* 1992; Callaghan *et al.* 2012 ; Lewis et Schwartz 2004).

Cheng *et al.* (2005 a et b) a montré que la taille des aérosols marins suit une distribution biphasique dont le premier pic, représentant les fines particules, se situe à $0,1\text{-}0,2 \mu\text{m}$ et le deuxième pic, représentant les plus grosses particules, est compris entre $2 \text{ et } 30 \mu\text{m}$.

Lewandowska *et al.* (2017) a confirmé que les toxines du phytoplancton présent à la surface de la mer peuvent s'aérosoliser après la lyse des cellules. Les aérosols marins sont donc composés de sels, de fragments de cellules et des toxines. (Pierce *et al.* 1988). Ils peuvent être inhalés et avoir un impact sur la santé humaine (Landsberg 2002 ; Ferrante *et al.* 2013).

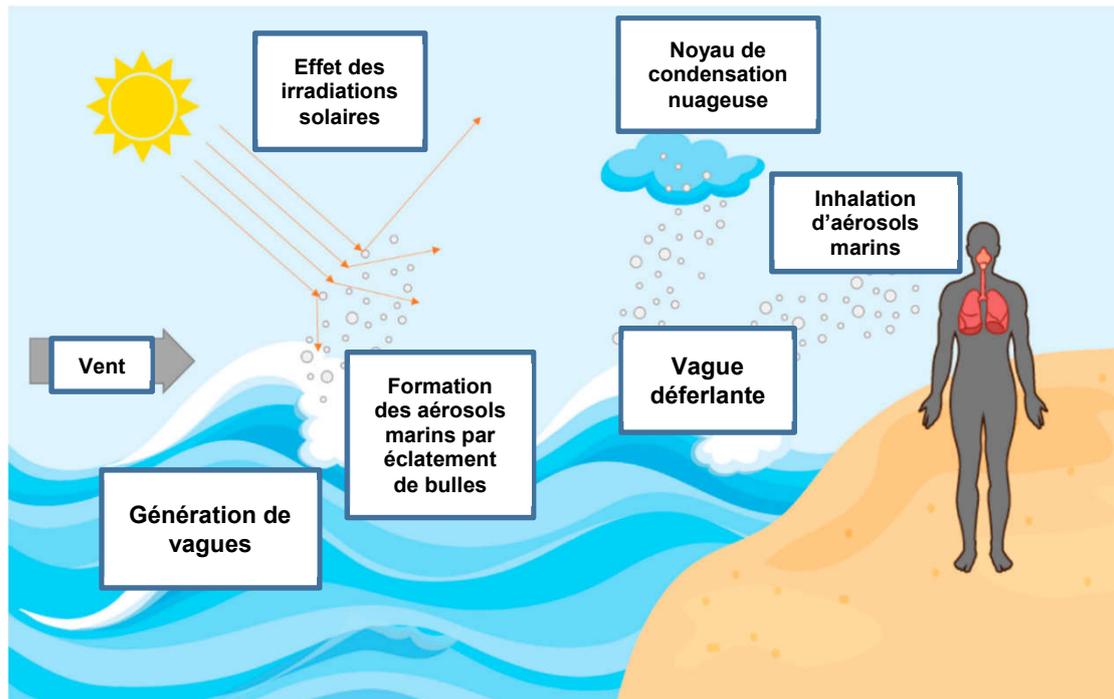


Figure 50 : Différentes voies possibles de formation des aérosols marins le long de l'interface air-mer due à l'interaction entre le vent et les vagues. (adaptée de Varlas *et al.* 2021)

Annexe 5 : Analyse des données concernant l'étude du potentiel mutagène et génotoxique des brevétoxines (par Fabrice Nessler)

Préambule

Un total de 9 publications abordant la mutagenèse et la génotoxicité des BTX a été retrouvé lors de la recherche bibliographique :

1. Gonzalez-Romero et al. 2017
2. Sayer et al. 2005
3. Sayer et al. 2006
4. Murrell 2008 (PhD Thesis)
5. Radwan & Ramsdell 2008
6. Phillips 2009 (PhD thesis)
7. Murrell et Gibson 2011
8. Leighfield et al. 2009
9. Murrell et Gibson 2009

L'objectif du présent rapport est d'analyser et de discuter des résultats obtenus dans ces publications, puis de conclure sur la mutagenèse et la génotoxicité des brevétoxines (BTX) intégrant la nécessité d'études complémentaires, le cas échéant.

Ainsi, ce rapport est découpé en 3 parties principales :

- I- Analyses des données de génotoxicité et de mutagenèse
- II- Discussion sur l'ensemble des données de génotoxicité et de mutagenèse
- III- Conclusion

I. Analyses des données de génotoxicité et de mutagenèse

1) ALTERATIONS PRIMAIRES DE L'ADN

a. Adduits à l'ADN

Dans un système acellulaire, après 18 h d'incubation à 37°C de BTX-6 à 200 µM avec 2 nucléosides isolés, l'analyse radio-immunologique (RIA, « radioimmunoassay ») a mis en évidence la possible formation d'adduits avec la cytidine et dans une moindre mesure avec la guanosine, adduits qui ne sont pas observés dans le groupe contrôle (Radwan et Ramsdell 2008).

Les auteurs ont ensuite montré qu'après une exposition de 18 h à 37°C d'une suspension de cellules pulmonaires de rat (lignée RFL-6), la quantité d'adduits en présence de BTX-2⁴³ (35 µM) était environ 4 fois supérieure à celle retrouvée en présence de BTX-6 (115 vs 34 pg équiv. BTX6/µg d'ADN). La LC-MS a permis d'identifier des adduits BTX2-cytidine mais pas d'adduits formés avec la BTX-6.

Dans cette même étude, des rats mâles [CrI:CD(SD)IGS BR VAF/Plus] ont reçu de la BTX-2 (groupe 1) ou de la BTX-6 (groupe 2) à 45 µg/kg de poids corporel par instillation intratrachéale (bolus). La dose maximale étudiée a été fixée d'après les résultats d'une étude préliminaire qui a permis de déterminer la dose maximale tolérable pour BTX-2. Les rats du groupe contrôle (groupe 3) ont reçu le même volume de véhicule. Les rats ont été sacrifiés 24 h après le traitement, et les poumons ont

⁴³ La BTX-2 est métabolisée au niveau hépatique et forme l'époxyde du cycle H (i.e., BTX-6)

été prélevés immédiatement et maintenus congelés à -80°C jusqu'à l'extraction de l'ADN, puis après hydrolyse, les adduits ont été purifiés, concentrés avant analyse par RIA ou par chromatographie liquide LC-MS. En termes de résultats, 24 h après l'exposition, une moyenne de 136,3 ng d'équivalents BTX-3/g de tissu pulmonaire a été mesurée pour le BTX-2, alors que près de 2 fois plus a été mesuré chez les rats exposés au BTX-6. Les analyses RIA de l'hydrolysate d'ADN ont montré une formation d'adduits environ 4 fois plus importante induite par l'exposition au BTX-2 (24 vs 6 pg équiv. BTX3/μg d'ADN). Par LC/MS, des adduits BTX2-guanosine, BTX2-adénine et BTX2-adénosine ont été mis en évidence à partir de l'ADN des cellules pulmonaires alors qu'aucun adduit de BTX6 n'a été identifié.

Les auteurs ont conclu que, *in vitro*, la BTX-2 forme des adduits d'ADN avec la cytidine après traitement de cellules pulmonaires isolées, et forme des adduits à l'ADN avec l'adénosine et la guanosine après exposition intratrachéale

Commentaires

De façon générale, les cancérogènes génotoxiques modifient la structure de l'ADN, principalement par des liaisons covalentes aux sites nucléophiles. Ces lésions sont appelées « adduits » à l'ADN. La réplication de l'ADN contenant des adduits non réparés peut soit engendrer des modifications de séquences (mutations) dans les molécules d'ADN filles nouvellement synthétisées, soit des réarrangements de l'ADN qui se manifestent par des aberrations chromosomiques. L'interprétation des taux d'adduits doit tenir compte de leur persistance, elle-même dépendante de la stabilité du produit, des systèmes de réparation et de la fréquence de renouvellement des macromolécules et de la cellule cible.

Les résultats de cette étude sont exprimés de façon qualitative, en comparant le « rapport d'induction » suite à un traitement avec la BTX-2 vs la BTX-6. Il n'y a pas d'information quantitative précise des adduits de l'ADN (par exemple, x adduits pour 10⁷ ou 10⁸ nucléotides) et aucune comparaison à des groupes non traités n'a été effectuée. On peut considérer qu'il s'agit d'une identification d'adduits (spécifiques) qui pourrait être utilisé comme marqueur d'exposition par exemple. En effet, il est admis que les adduits à l'ADN peuvent être utilisés comme des indicateurs de l'exposition biologique réelle.

Enfin, dans une approche de type « poids des preuves », les adduits *in vitro* et *in vivo* ont un poids faible (tableau 1).

Tableau 1 : Poids des résultats de génotoxicité selon le système d'essai (selon Brusick et al, 2016)⁴⁴

Endpoint	Negligible Weight	Low Weight	Moderate Weight	High Weight
DNA binding (adduct formation) <i>in vitro</i>				
DNA binding (adduct formation) <i>in vivo</i>				
SSB/DSB <i>in vitro</i> (incluina comet)				
SSB/DSB <i>in vivo</i> (incluina comet)				
SCEs <i>in vitro</i>				
SCEs <i>in vivo</i>				
Oxidative DNA Damage <i>in vitro</i>				

⁴⁴ Brusick D, Aardema M, Kier L, Kirkland D, Williams G Genotoxicity Expert Panel review: weight of evidence evaluation of the genotoxicity of glyphosate, glyphosate-based formulations, and aminomethylphosphonic acid. Crit Rev Toxicol. 2016 Sep; 46(sup1):56-74.

Oxidative DNA Damage <i>in vivo</i> (detection)				
DNA repair effects <i>in vitro</i>				
DNA repair effects <i>in vivo</i>				
Micronuclei <i>in vitro</i>				
Micronuclei <i>in vivo</i> (including human)				
Chromosomal aberrations <i>in vitro</i>				
Chromosomal aberrations <i>in vivo</i>				
Gene mutation in bacteria (Ames Test)				
Gene mutation mammalian <i>in vitro</i>				
Gene mutation <i>in vivo</i>				

Evidence Weighting: We therefore assigned weights according to the following 4 categories:

Negligible weight – the endpoint is not linked to any adverse effect relevant to genetic or carcinogenic hazard/risk and as such is not given weight as evidence of genotoxicity.

Low weight – the end point is indicative of primary DNA damage, is not unequivocally linked to mechanisms of tumorigenicity, and the test system has low specificity

Moderate weight – the endpoint is potentially relevant to tumorigenicity or may be subject to secondary, threshold-dependent mechanisms of induction (e.g. cytotoxic clastogens, aneugens) or the test system exhibits a high rate of misleading positives with respect to carcinogen prediction or mode of action

High weight – the endpoint is one that has been demonstrated with a high level of confidence to play a critical role in the process of tumorigenicity.

La présence d'adduits à l'ADN a été démontrée de façon qualitative *in vitro* et *in vivo*. Ces études ne permettent pas de rendre compte de la significativité biologique La présence d'adduits à l'ADN. De plus, dans une approche de type WoE, les adduits *in vitro* et *in vivo* ont un poids faible, à ce titre, ils pourraient tout au plus constituer une alerte qu'il serait nécessaire de confirmer dans des expérimentations consolidées.

Si l'interprétation des taux d'adduits doit tenir compte de leur persistance, elle-même dépendante de la stabilité du produit, des systèmes de réparation et de la fréquence de renouvellement des macromolécules et de la cellule cible, l'identification d'adduits (spécifiques) pourrait être utilisée comme marqueur d'exposition biologique réelle.

b. Fragmentation de l'ADN

i. Test des Comètes *in vitro*

Trois tests des Comètes *in vitro* (fragmentation de l'ADN) ont été réalisés et sont décrits ci-dessous.

Des lymphocytes humains ont été exposés aux BTX2, BTX3 et BTX9 à 2 niveaux de concentrations (1 pM et 10 nM) pendant 1 h (avec ou sans pré-traitement avec 1 µg/ml de brevenal à 4°C pendant 1 h) en triplicate. Le test des comètes a ensuite été réalisé et la fragmentation de l'ADN, a été quantifiée à l'aide d'un système d'analyse d'images pour au moins 150 cellules/groupe (50 cellules/lame, au moins 3 lames pour les groupes traités) puis le paramètre de fragmentation « Tail moment » a été calculé (Sayer A et al, 2005). Les résultats sont présentés dans le Tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2 : « Tail moment » des lymphocytes humains exposés à différentes BTX (d'après Sayer et al, 2005).

1 h de traitement			2 h de traitement		
Treatment	N	Tail moment Mean ± SE	Treatment	N	Tail moment Mean ± SE
Negative control	30	29.2 + 0.9	Negative control	30	29.2 + 0.9
H ₂ O ₂ (2.75%)	30	72.1 + 1.5*	H ₂ O ₂ (2.75%)	30	72.1 + 1.5*
Solvent (EtOH)	3	24.2 + 2.1	2 h. PbTx-2 10 ⁻⁸ M (Sigma)	3	50.1 + 2.0*
PbTx-2 10 ⁻⁸ M (Sigma)	6	41.3 + 3.6*	2 h. PbTx-2 10 ⁻⁸ M (UNCW)	3	51.0 + 2.4*
PbTx-2 10 ⁻¹² M (Sigma)	3	46.85 + 1.5*	2 h. PbTx-3 10 ⁻⁸ M (UNCW)	3	49.1 + 0.8*
PbTx-2 10 ⁻⁸ M (UNCW)	3	49.4 + 9.9*	2 h. PbTx-9 10 ⁻⁸ M (Sigma)	3	50.1 + 1.8*
PbTx-2 10 ⁻¹² M (UNCW)	3	41.8 + 8.1*			
PbTx-3 10 ⁻⁸ M (UNCW)	6	54.0 + 6.4*			
PbTx-3 10 ⁻¹² M (UNCW)	3	41.4 + 5.2*			
PbTx-9 10 ⁻⁸ M (Sigma)	3	57.0 + 5.3*			
PbTx-9 10 ⁻¹² M (Sigma)	3	41.0 + 2.9*			

*Significantly different from the negative control, $p < 0.05$.

D'après les auteurs, les BTX testées à des concentrations de 1 pM et 10 nM induisent de la fragmentation de l'ADN dans les lymphocytes humains. Le niveau de fragmentation de l'ADN des lymphocytes humains exposés pendant 2 h à la concentration de 10 nM étaient d'une ampleur similaire à une exposition de 1 h.

Un second test des comètes a été réalisé sur des cellules de Jurkat E6-145 (Murrell et Gibson, 2009). Pour cette étude, un essai préliminaire de toxicité a été effectué afin de déterminer la concentration inhibant la prolifération cellulaire de 50 % (IC₅₀). Pour cela, les cellules ont été exposées aux concentrations allant de 10⁻⁴ (BTX3 et BTX6) ou 10⁻⁵ (BTX2) à 10⁻¹²M en triplicate pendant 48 h à 37°C. Le milieu seul a été utilisé comme groupe contrôle négatif.

Ensuite, le test des comètes a été réalisé exclusivement à l'IC₅₀ et la fragmentation de l'ADN a été quantifiée à l'aide d'un système d'analyse d'images pour au moins 150 cellules/groupe (50 cellules/lame, au moins 3 lames pour les groupes traités). Le paramètre « Tail moment » a été calculé. Les résultats sont présentés ci-dessous. Le potentiel apoptotique a été évalué à l'aide de la méthode YO-PRO/iodure de propidium⁴⁶ ainsi que par la mesure des caspases 3/7 et 8.

⁴⁵ Lignée de lymphocytes T CD4, classiquement utilisée en remplacement des lymphocytes T circulants

⁴⁶ L'apoptose a été mesurée sur la base des changements qui se produisent dans la perméabilité des membranes cellulaires : la coloration YO-PRO-1 passe sélectivement à travers les membranes plasmiques des cellules apoptotiques et les marque avec une fluorescence verte modérée alors que les cellules nécrotiques sont colorées en rouge-fluorescence avec l'iodure de propidium.

Tableau 3 : « Tail moment » des cellules Jurkat E6-1 exposés à différentes BTX à l'IC₅₀ (d'après Murrell & Gibson, 2009).

Brevetoxine 2			Brevetoxines 3 et 6		
Treatment	N	Tail Moment Mean ± SE	Treatment	N	Tail moment Mean ± SE
Negative control	3	15.9 ± 1.1	Negative control	3	26.3 ± 0.5
H ₂ O ₂ (1.75%)	3	33.8 ± 2.6*	H ₂ O ₂ (1.75%)	3	85.4 ± 2.2*
PbTx2 10 ^{-5.25} M	3	27.1 ± 1.5*	PbTx3 10 ^{-4.5} M	3	41.9 ± 1.9*
			PbTx6 10 ⁻⁵ M	3	44.0 ± 2.3*

* Significantly different from the negative control, *P* < 0.05

D'après les auteurs, la BTX2 à 5,6 µM, la BTX3 à 32 µM et la BTX6 à 10 µM ont induit des cassures de brins de l'ADN vis-à-vis des cellules Jurkat E6-1. Il faut également noter qu'en utilisant la méthode utilisant le YO-PRO/iodure de propidium et la mesure des caspases 3/7 et 8, les BTX2, BTX3 et BTX6 ont induit une augmentation de l'apoptose des cellules Jurkat E6-1 à des concentrations inférieures à celles qui ont amené un test des comètes positif. Un traitement de ces cellules par la BTX2 (10 µM) pendant 4 h a aussi induit l'expression de gènes d'enzymes de réparation de l'ADN et de facteurs pro-apoptotiques.

Un 3^{ème} test des comètes *in vitro* a été réalisé sur des cellules épithéliales pulmonaires humaines normales (BEAS-2B) et néoplasiques (H460)⁴⁷ exposées pendant 1 h à 37°C à la BTX3 aux 3 concentrations de 10, 100 et 500 nM (Philips, 2009). Le test des comètes a été réalisé de façon standard et optimisée (en présence de Fpg)⁴⁸ afin de cibler les dommages oxydatifs de l'ADN.

La fragmentation de l'ADN a été quantifiée à l'aide d'un système d'analyse d'images pour environ 150 cellules/concentration (cellules prises dans un minimum de 3 champs microscopiques choisis au hasard / échantillon et pour 3 cultures). Le paramètre « Tail moment » a été calculé. Les résultats sont présentés dans les Figures 1 et 2 ci-dessous.

⁴⁷ Lignée isolée du liquide pleural d'un homme caucasien en 1982. Selon la caractérisation de l'ATCC, cette lignée cellulaire exprime l'ARNm p53 à des niveaux proches de ceux des tissus sains et exprime l'EGFR de type sauvage.

⁴⁸ La Fpg (Formamidopyrimidine glycosylase) reconnaît les dommages induits par l'oxydation de bases et catalyse l'excision de la base endommagée par hydrolyse des liaisons N-glycosyliques, convertissant les sites de dommages des bases en sites de pertes de bases (sites apuriniques/aprimidiniques (AP). Il faut préciser que la Fpg n'est pas spécifique des lésions oxydées de l'ADN (outre les bases oxydées et modifiées, *i.e.* 8-oxo-dG, 8-oxo-dA, Tg..., elle reconnaît également les formamido-pyrimidines (fapy-dG, fapy-dA), les sites abasiques...).

Figure 1 : « Tail moments » des cellules épithéliales bronchiques humaines après exposition de 1 h à la BTX-3 (d'après Philips, 2009)

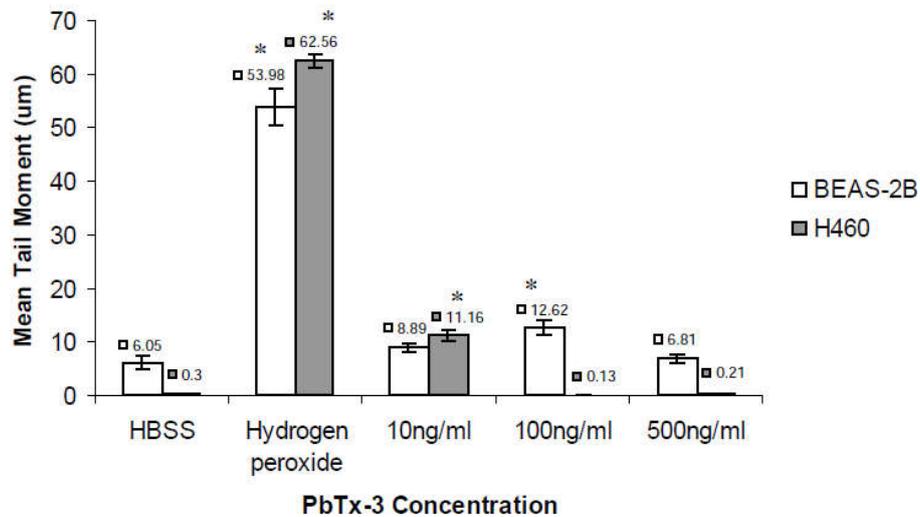
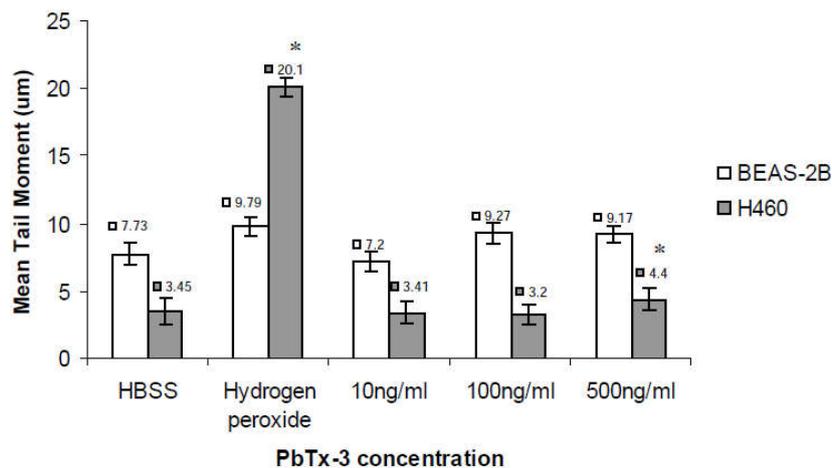


Figure 2 : « Tail moments » des cellules épithéliales bronchiques humaines après exposition de 1 h à la BTX-3 en présence de Fpg (d'après Philips, 2009)



* indique un résultat significativement différent du contrôle négatif

Sur les cellules BEAS-2B, le test des comètes standard s'est révélé statistiquement significatif uniquement pour la concentration intermédiaire de 111 nM. En présence de Fpg, aucun effet statistiquement significatif n'a été noté, quelle que soit la concentration. Sur les cellules H460, le test des comètes standard s'est révélé statistiquement significatif uniquement pour la concentration faible de 11 nM. En présence de Fpg, une augmentation statistiquement significative de la fragmentation de l'ADN a été observée à la concentration maximale testée de 500 nM.

Par ailleurs, un marqueur associé aux cassures double-brins (test « γ -H2A.X ») a été utilisé parallèlement au test des comètes. Les résultats des pourcentages moyens de cellules présentant une phosphorylation de l'histone H2A.X après exposition à BTX-3 sont présentés ci-dessous.

Tableau 4 : Pourcentage moyen de cellules épithéliales bronchiques humaines présentant une phosphorylation de l'histone H2A.X après exposition à BTX-3 (d'après Philips, 2009)

Concentration BTX-3	BEAS-2B (Moyenne ± SE)	H-460 (Moyenne ± SE)
Contrôle négatif (HBSS)	0.35 ± 0.07	0.15 ± 0.03
Contrôle positif (1 µM staurosporine)	8.82 ± 2.31 *	33.49 ± 3.62 *
10 ng/ml PbTx-3	0.15 ± 0.02	0.12 ± 0.03
100 ng/ml PbTx-3	0.14 ± 0.05	0.15 ± 0.02
500 ng/ml PbTx-3	0.10 ± 0.02	0.39 ± 0.25

* Significativement différent du contrôle négatif. $p < 0,05$ (t de Student)

Au cours du test γ -H2AX, aucune augmentation statistiquement significative n'a été notée, quelle que soit la concentration de BTX-3 et la lignée cellulaire utilisée.

Commentaires sur les études de fragmentation de l'ADN *in vitro*

Actuellement, il n'existe pas de ligne directrice concernant le test des comètes *in vitro* néanmoins, des recommandations ont été proposées (Tice *et al*, 2000; Hartmann *et al*, 2004)^{49,50}. Si l'on se réfère à ces recommandations, de nombreuses déviations et limites importantes ont été notées :

- Selon ces recommandations, la diminution de la viabilité ne devrait pas être supérieure à 30% par rapport au groupe témoin négatif (Tice *et al*, 2000). En effet, la viabilité des cellules isolées < 70 % par rapport au témoin négatif doit être considérée comme excessive car elle pourrait interférer avec le système d'essai (en d'autres termes, la fragmentation mesurée pourrait ne pas être liée à des phénomènes génotoxiques mais cytotoxiques). Or, les niveaux de cytotoxicité ne sont pas renseignés dans 2 études (Sayer *et al*, 2005 ; Philips, 2009). En outre, dans l'étude de Murrell et Gibson (2009), le test des comètes a été réalisé exclusivement à l'IC₅₀ ce qui rend les résultats inutilisables.
- Il est théoriquement nécessaire d'étudier au moins 3 niveaux de concentrations et d'utiliser des cultures en triplicate, avec lecture de 100 cellules/culture soit un total de 600 cellules/concentration (Singh *et al*, 1988)⁵¹. Or, dans les tests des comètes cités, il n'y a parfois qu'une (Murrell et Gibson, 2009) ou 2 doses testées (Sayer *et al*, 2005), et 2 cultures (soit analyse de 100 cellules/groupe).
- Les auteurs n'évoquent pas le dénombrement des cellules « fantômes »⁵² qui sont des indicateurs morphologiques de cellules très endommagées. Il a été suggéré d'utiliser les cellules fantômes comme indicateur de cytotoxicité, même si leur étiologie est incertaine car elles peuvent être associées à une génotoxicité, une nécrose ou une apoptose. Dans tous les cas, il convient de les exclure du comptage principal et de les évaluer séparément. En outre, il est intéressant de noter que dans l'étude de Murrell et Gibson (2009), les BTX2, BTX3 et BTX6 ont induit une augmentation de l'apoptose vis-à-vis des cellules Jurkat E6-1

⁴⁹ Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.C., Sasaki Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, Environ. Mol. Mutagen. 35 (2000) 206-221.

⁵⁰ Hartmann A, Schumacher M, Plappert-Helbig U, Lowe P, Suter W, Mueller L. Use of the alkaline in vivo Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. Mutagenesis. 2004 Jan;19(1):51-9.

⁵¹ Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res. 1988 Mar;175(1):184-91.

⁵² Couramment désignées comme « highly damaged cells », « ghost cells » ou encore « hedgehogs »

à des concentrations inférieures à celles qui ont amené un test des comètes positif. Ainsi, la probabilité d'une interférence entre le paramètre biologique mesuré (fragmentation de l'ADN) et l'apparition d'apoptose ne peut donc pas être exclue.

- Concernant le paramètre de quantification de la fragmentation, le « *Tail Moment* » n'est plus considéré comme le paramètre de choix pour mesurer la fragmentation de l'ADN. En effet, celui-ci correspond au pourcentage d'ADN dans la queue de la comète multiplié par la longueur mesurée entre le centre de la tête et le centre de la queue. Lors de l'IWGT de 2005, le pourcentage d'ADN dans la queue (*Tail DNA* ou *Tail Intensity*) a été reconnu comme le paramètre principal le mieux approprié pour quantifier la fragmentation de l'ADN. En outre, ce paramètre est linéairement lié aux dommages induits à l'ADN pour un large éventail de dommages et est lié au taux de fragmentation de l'ADN (Hartmann et al, 2003)⁵³. Il présente également l'avantage de pouvoir être "normalisé" (comparaison possible entre différentes études), et il est indépendant des seuils de réglage des systèmes d'analyse d'images (Collins, 2004)⁵⁴.
- Dans ces études, les niveaux de fragmentation du groupe témoin négatif apparaissent comme très élevés (ca 30 % dans l'étude de Sayer et al, 2005). A titre d'exemple, la ligne directrice de l'OCDE N°489 indique que « *le pourcentage moyen d'ADN de queue du groupe (d'après la moyenne des médianes dans le foie de rat devrait, de préférence, ne pas dépasser 6 %* ». Cela tend à démontrer que la méthode utilisée pour isoler les cellules n'est pas adaptée et a un impact direct sur la nature des résultats.
- Concernant l'interprétation des résultats :
 - Pour qu'un produit soit considéré comme ayant des propriétés génotoxiques, une augmentation statistiquement significative de la médiane des pourcentages d'ADN dans la queue par rapport au témoin solvant doit être démontrée et l'effet génotoxique mis en évidence doit être accompagné d'une relation dose-effet. Toutefois, une augmentation statistiquement significative avec des valeurs qui se situent à l'intérieur des limites des témoins historiques peut être considérée comme non pertinente biologiquement. Malheureusement, aucune étude ne réfère à des niveaux « spontanés » attendus (témoins historiques) ce qui empêche toute appréciation d'un éventuel effet biologiquement significatif.
 - Dans l'étude de Sayer et al (2005), les niveaux de fragmentation obtenus pour les 2 concentrations testées qui sont pourtant très espacées (10 et 0,01 nM) sont comparables pour la quasi-totalité des BTX (cf Tableau 1), ce qui particulièrement surprenant pour des doses séparées d'un facteur 1000.
 - Dans les essais de Philips (2009), les résultats vis-à-vis des cellules H460 semblent incohérents. En effet, une réponse « positive » est notée uniquement à la dose minimale de 10 ng/ml dans l'essai sans Fpg ce qui pourrait s'expliquer par une probable trop forte cytotoxicité aux doses supérieures entraînant une perte d'information. Or, une réponse significative est observée uniquement à la dose maximale en présence de Fpg (cf Figures 1 et 2).

⁵³ Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice RR. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis*. 2003 Jan;18(1):45-51.

⁵⁴ Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol*. 2004 Mar;26(3):249-61.

- Enfin, comme indiqué dans le paragraphe précédent concernant les adduits à l'ADN, dans une approche de type WoE, les tests d'altération primaire de l'ADN ont un poids faible (Brusick *et al*, 2016)¹² C'est le cas du test des comètes *in vitro*.

En conclusion, l'ensemble des déviations majeures notées pour ces tests des comètes *in vitro* ne permet ni de valider les résultats ni de cautionner leur interprétation. La fragmentation de l'ADN telle qu'évaluée au travers le test des comètes réalisé sous sa version alcaline (pH>13) pourrait néanmoins être un des paramètres biologiques sensibles qu'il pourrait être opportun d'étudier pour les BTX le cas échéant.

ii. Test des Comètes *in vivo*

Des groupes de rats mâles Fischer F344 ont été exposés par voie intratrachéale à la brevétoxine B (45 µg/kg). Différentes paires d'animaux ont été traités (véhicule ou BTX-2) sur 3 jours consécutifs. Les foies (et les poumons) ont été prélevés 24 heures après l'exposition pour analyse de la fragmentation de l'ADN à l'aide d'un test des comètes (Leighfield, Muha et Ramsdell 2009).

Les rats traités à la brevétoxine B (PbTx2) ont montré une augmentation de la quantité d'ADN dans la queue de deux à trois fois celle du groupe témoin excipient respectif. Les %Tail DNA dans les groupes traités ont été significativement différents (Mann-Whitney, $p < 0,05$) de ceux des témoins, pour chaque paire d'animaux (Figure 3).

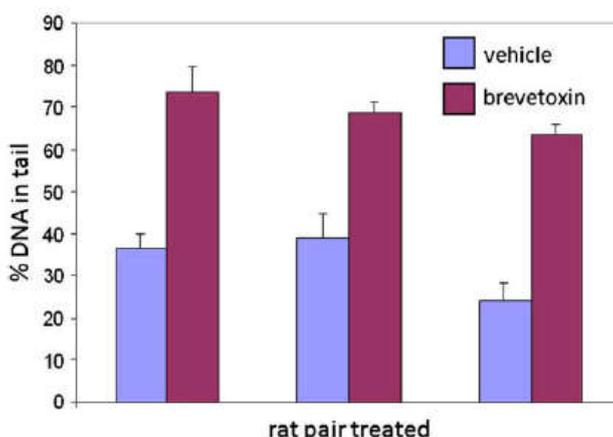


Figure 3 : Résultats du test des comètes (% moyen d'ADN dans la queue) au niveau du foie de rats mâles traités avec BTX-2. Différentes paires d'animaux ont été traités (véhicule ou PbTx2) sur 3 jours consécutifs (d'après Leighfield, Muha et Ramsdell, 2009).

D'après les auteurs, cela indique que la PbTx2 a une activité clastogène *in vivo*.

Commentaires sur le test des comètes *in vivo*

En réalité, seul le foie a fait l'objet d'une évaluation de la fragmentation de l'ADN (les cellules pulmonaires n'ont pas été analysées car, selon les auteurs, la préparation des cellules du foie était plus homogène par rapport aux cellules du poumon !).

Le protocole utilisé diffère en de très nombreux points de la méthode standardisée du test des comètes *in vivo* et est entaché de déviations dont les majeures sont citées ci-après. En effet, selon la ligne directrice de l'OCDE (2016) :

- Concernant le design de l'étude :
 - Il est nécessaire d'avoir *a minima* 3 groupes traités et des groupes concurrents de témoins négatifs et de témoins positifs (au final, il faut au moins cinq animaux analysables d'un même sexe pour chaque groupe, témoin et traités) et les

échantillons doivent être collectés une fois entre 2-6 h après le dernier traitement. Or, dans l'étude de Leighfield, Muha et Ramsdell (2009), il est indiqué que différentes paires d'animaux ont été traités (véhicule ou PbTx2) sur 3 jours consécutifs. Ce design expérimental reste confus, même si on peut comprendre que 3 lots de 2 animaux ont été traités, un avec l'excipient et le 2nd avec PbTx2 à 45 µg/kg ce qui donne au total 3 animaux traités à une seule dose.

- Concernant l'analyse :
 - Un minimum de 150 cellules par animal chez au moins 5 animaux par dose doit être analysé (600 cellules / groupe) ce qui permet d'assurer une puissance statistique satisfaisante. Or, dans cette étude, l'analyse a été réalisée sur une trentaine de cellules hépatiques.
- Concernant l'interprétation des résultats :
 - Pour qu'un produit soit considéré comme ayant des propriétés génotoxiques, une substance est considérée comme clairement positif si :
 - a. au moins une des doses d'essai présente une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant,
 - b. un test de tendance approprié montre que l'augmentation est liée à la dose,
 - c. des résultats se situent à l'extérieur de la distribution des données des témoins négatifs historiques pour une espèce, un véhicule, une voie, un tissu et un nombre d'administrations donnés.

Comme déjà mentionné, une augmentation statistiquement significative avec des valeurs qui se situent à l'intérieur des limites des témoins historiques peut être considérée comme non pertinente biologiquement. Malheureusement, aucune étude ne réfère à des niveaux « spontanés » attendus (témoins historiques) ce qui empêche toute appréciation de la significativité biologique. De plus, une seule dose a été testée ce qui empêche toute évaluation d'une éventuelle relation dose-effet.

- Les résultats obtenus dans les groupes témoin négatif sont considérables (jusqu'à près de 40% de Tail DNA) ce qui indique que la méthode de préparation des échantillons était inappropriée et/ou que les échantillons ont été mal « conservés ». Il est connue que les suspensions cellulaires doivent être conservés à très basse température jusqu'à ce qu'elles soient prêtes à être utilisées, afin de pouvoir mettre en évidence une variation inter-échantillons minimale et des réponses appropriées chez les témoins positifs et négatifs (Guerard et al, 2014)⁵⁵.
- Les auteurs n'évoquent pas le dénombrement des cellules « fantômes » qui sont des indicateurs morphologiques de cellules très endommagées qui doivent théoriquement être exclues du comptage principal et de les évaluer séparément.

En conclusion, l'ensemble de ces déviations majeures ne permet en aucun cas de valider les résultats de ce test des comètes *in vivo* et d'endosser son interprétation. La fragmentation de l'ADN telle qu'évaluée au travers le test des comètes réalisé sous sa version alcaline (pH>13) pourrait néanmoins être un des paramètres biologiques sensibles qu'il pourrait être opportun d'étudier pour les BTX, en seconde intention le cas échéant.

Note : Contrairement à ce qu'affirment les auteurs, une augmentation de la fragmentation de l'ADN dans le test des comètes ne signifie pas que la substance est clastogène. En effet, en conditions alcalines (pH > 13), le test des comètes peut détecter les cassures simple- et double-brin résultant,

⁵⁵ Guerard, M., C. Marchand, U. Plappert-Helbig (2014), Influence of Experimental Conditions on Data Variability in the Liver Comet Assay, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 55/2, pp. 114-21.

par exemple, d'interactions directes avec l'ADN, de sites alcali-labiles ou de cassures transitoires liées à des mécanismes de réparation par excision. Ces cassures peuvent être réparées, leur effet étant alors non persistant, elles peuvent être létales pour la cellule, ou elles peuvent se fixer sous forme de mutation stable se traduisant par une altération viable permanente ou entraîner des dommages chromosomiques. Il s'agit ici d'un abus de langage et d'une probable méconnaissance du test.

2) MUTATION GENIQUE IN VITRO

Au cours d'un test de mutagenèse sur un système d'essai bactérien (test d'Ames MPF®) réalisé vis-à-vis des souches de *Salmonella typhimurium* TA98 et TA100, la brevetoxine BTX-2 à des concentrations de 0,064 à 200 µg/mL n'a pas induit d'augmentation significative du nombre de révertants que ce soit en absence ou en présence d'un système exogène d'activation métabolique (microsomes de foie de rat induits par Aroclor 1254). De même, l'époxyde de la brevetoxine B (BTX6) testé uniquement sans activation métabolique s'est révélé non mutagène dans ce test à des concentrations allant de 0,064 à 200 µg/mL (Leighfield, Muha, et Ramsdell, 2009).

Commentaires :

Le test effectué par Leighfield, Muha et Ramsdell (2009) est le test d'Ames MPF® (Microplate Format Mutagenicity Assay). Il s'agit d'une version miniaturisée du test d'Ames réalisé en fluctuation dans des plaques 384 puits avec une lecture basée sur le changement colorimétrique lié à la croissance de colonies révertantes (ajout de violet de bromocrésol utilisé comme indicateur qui devient jaune lorsque le pH baisse en raison de l'activité catabolique des bactéries mutantes)⁵⁶.

Au-delà du fait que ce type de test ne dispose pas de ligne directrice, il comporte des différences et limites très importantes par rapport à un test d'Ames standard consolidé. En effet, la concentration maximale testée est de 200 µg/mL alors que la ligne directrice de l'OCDE N°471 recommande 5000 µg/boîte (même s'il est très difficile de comparer des concentrations volumiques à des doses massiques). Il est communément admis que le seuil de sensibilité du test d'Ames (std) est de 250 µg/boîte.

Par ailleurs, si Ames MPF® est réalisable vis-à-vis de toutes les souches classiquement utilisées dans un test d'Ames std, les auteurs ont limité l'étude à 2 souches au lieu de 5 recommandés. Ainsi, aucune souche proficiente en systèmes de réparation (exemple souche TA102) n'a été utilisée ce qui ne permet pas de mettre en évidence certains événements génétiques de type pontage par exemple.

En conclusion, si aucune augmentation significative du nombre de colonies révertantes n'a été observée au cours d'une étude d'Ames MPF® réalisé vis-à-vis des souches de *Salmonella typhimurium* TA98 et TA100, les conditions expérimentales de cet essai de screening comportent trop de limites importantes et ne permettent pas de conclure quant au potentiel mutagène de BTX et de son métabolite oxydé BTX-6 sur un système d'essai bactérien. En outre, les résultats « négatifs » ne peuvent pas être considérés comme pertinents.

Dans ces conditions, une étude d'Ames complète utilisant au moins 5 souches bactériennes (e.g., *Salmonella typhimurium* TA 1535, TA1537, TA 98, TA 100 et TA102 ou *Escherichia coli* WP2 Pkm101) devrait être réalisée avec et sans activation métabolique, selon les recommandations de la ligne directrice OCDE 471. Néanmoins, une attention particulière

⁵⁶ S Flückiger-Isler, M Kamber. The Ames MPF™ 98/100 assay: novel mutagenicity testing in liquid microplate format using *S. typhimurium* TA98 and TA100 - Prague: EEMS, 2006 - tigrat.eu

devra être portée en cas d'un test négatif avec une dose maximale analysable < 250µg/boite. En effet, comme l'indiquent Müller et al (2006)⁵⁷, la plupart des effets mutagènes sont normalement détectables à des niveaux de 250 µg/boite. Selon Kenyon et al (2007)⁵⁸, la limite de sensibilité estimée pour la plupart des mutagènes pertinents dans le test d'Ames est la concentration minimale de 250µg/boite. Dans ce cas, le test d'Ames devra être considéré comme insuffisamment pertinent, et le potentiel d'induction de mutation génique devra être évalué sur des cellules de mammifères (par exemple, à l'aide du test MLA/TK, OCDE 490).

3) ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES *IN VITRO*

L'induction d'aberrations chromosomiques (AC) par la BTX-2 a été évaluée *in vitro* vis-à-vis de cellules ovariennes de hamster chinois (cellules CHO-K1-BH4) traitées en triplicate pendant 48 heures exclusivement à l'IC₅₀, i.e. 10⁻⁷ M (Sayer et al, 2006). Un total de 150 métaphases a été analysé (50 /culture pour chaque réplicat).

Tableau 5 : Aberrations chromosomiques analysées dans les cellules CHO-K1-BH4 dans le groupe témoin et le groupe traité avec la BTX-2 à 10⁻⁷ M (d'après Sayer et al, 2006).

Treatment day	Number of chromosome pairs counted (in 50 cells)	Gaps	Breaks	Other ^b
Controls				
1	1054		1	
2	1039			1
3	1090	1		
Totals	3183	1	1	1
Total number of damaged chromosome pairs: 3		Percentage of chromosomes damaged: 0,09%		
BTX-2 10 ⁻⁷ M				
1	1031	5	4	12
2	1050	5	2	12
3	1050	5	1	8
Totals	3131	15	7	32
Total number of damaged chromosome pairs: 54^a		Percentage of chromosomes damaged: 1,7%		

^a Indicates significance compared to control and MMC treated groups.

^b Autres anomalies intègrent les fragments terminaux alignés et déplacés ; échanges dicentriques et centraux ; non-appariement proximaux distaux et sœurs ; échanges symétriques et asymétriques ; intra-échanges symétriques et asymétriques ; cassures triradiales monocentriques et dicentriques

NB : Un témoin positif de référence a été réalisé mais n'est pas présenté ici

Selon les auteurs, le groupe traité à la BTX-2 a présenté de nombreuses anomalies chromosomiques avec une augmentation statistiquement significative par rapport au groupe témoin (1,7 % vs 0,09%).

⁵⁷ Müller L, Mauthe RJ, Riley CM, Andino MM, Antonis DD, Beels C, DeGeorge J, De Knaep AG, Ellison D, Fagerland JA, Frank R, Fritschel B, Galloway S, Harpur E, Humfrey CD, Jacks AS, Jagota N, Mackinnon J, Mohan G, Ness DK, O'Donovan MR, Smith MD, Vudathala G, Yotti L. A rationale for determining, testing, and controlling specific impurities in pharmaceuticals that possess potential for genotoxicity. Regul Toxicol Pharmacol. 2006 Apr;44(3):198-211.

⁵⁸ Kenyon MO, Cheung JR, Dobo KL, Ku WW. An evaluation of the sensitivity of the Ames assay to discern low-level mutagenic impurities. Regul Toxicol Pharmacol. 2007 Jun;48(1):75-86.

Commentaires :

Le protocole utilisé diffère en de nombreux points de la méthode standardisée du test d'aberrations chromosomiques *in vitro* et est entaché de déviations citées ci-après. En effet, selon la ligne directrice de l'OCDE (2016) :

- Concernant le design de l'étude :
 - Un seul type d'essai utilisant un temps long de 48 h de traitement sans activation métabolique a été réalisé. En outre, avec un temps de doublement des cellules CHO compris entre 12 et 28 h pour les cellules CHO (Eibl et al., 2009)⁵⁹, cette durée de traitement est très supérieure à 1.5 fois la durée normale du cycle cellulaire recommandé par la ligne directrice de l'OCDE 473. De plus, pour une évaluation complète, trois conditions expérimentales doivent être respectées avec un traitement de courte durée (3-6 h) avec et sans activation métabolique, et un traitement de longue durée sans activation métabolique (environ 1,5 fois la durée normale du cycle cellulaire).
 - Une seule concentration a été investiguée alors qu'un minimum de 3 concentrations est requis.
- Concernant l'analyse :
 - Aucune évaluation de la cytotoxicité n'a été effectuée.
 - Environ 150 métaphases (environ 3000 chromosomes analysés sur des cellules CHO qui ont un nombre de chromosomes $2n = 22$) ont été examinées alors qu'il y a lieu d'examiner au moins 300 cellules en métaphase par groupe.
- Concernant l'interprétation des résultats :
 - La catégorie « *Other* » inclut des événements mineurs (fragments terminaux alignés et déplacés – non-appariement), des anomalies qu'il semble impossible à affirmer sans des techniques spécifiques qui ne sont pas mentionnées dans la publication (ex., *intra-échanges symétriques*) et des anomalies majeures (échanges, cassures triradiales). La sous-catégorie « échanges » aurait dû être distincte. Sans distinction, il n'est pas possible d'apprécier s'il y a réellement présence ou non d'aberrations de type « échange » qui sont considérés comme correspondant à de la clastogénèse vraie (double événement génétique) et biologiquement significative.
 - Il n'est pas possible d'évaluer les résultats selon les critères définis dans la ligne directrice de l'OCDE 473 qui comporte les 3 points suivants :
 - a) au moins une concentration présente une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant,
 - b) un test de tendance montre que l'augmentation est liée à la dose
 - c) des résultats se situent à l'extérieur de la plage de distribution des témoins négatifs historiques

Remarques :

La souche cellulaire utilisée correspond à une lignée murine, déficiente p53 et ayant une forte instabilité caryotypique. On ne peut donc pas exclure que l'effet observé soit exclusivement lié à

⁵⁹ Eibl, D., Eibl, R., & Pörtner, R. (2009). Mammalian cell culture technology: an emerging field Cell and Tissue Reaction Engineering (pp. 3-11): Springer

l'instabilité génétique de cette lignée cellulaire donc qu'un réel effet clastogène intrinsèque à la BTX-2 existe.

Le total du nombre d'anomalies chromosomiques tel que calculé ne reflète pas exclusivement un éventuel effet clastogène ; en effet, les "gaps" ne doivent pas être calculés dans cette catégorie puisqu'ils correspondent à des phénomènes cytotoxiques et non génotoxiques (le total est donc de 39).

En conclusion, dans ces conditions expérimentales, il apparaît impossible de conclure quant au potentiel d'induction d'aberrations chromosomiques *in vitro* de la BTX-2. Une étude d'aberrations chromosomiques complète (préférentiellement le test *in vitro* du micronoyau OCDE TG 487, tel que recommandé par l'Efsa, 2011) devrait être réalisée en utilisant préférentiellement des cellules humaines, stables sur le plan génomique, par exemple des lymphocytes humains. Cette nouvelle étude devrait être réalisée avec et sans activation métabolique et en utilisant des temps de traitement courts et longs sans activation métabolique, selon les recommandations de la ligne directrice.

II. Discussion sur l'ensemble des données de génotoxicité et de mutagenèse

Dans les 9 publications qui ont visé à évaluer la mutagenèse et la génotoxicité de brevétoxines, on dispose d'études portant sur le potentiel d'induction d'altérations primaires de l'ADN *in vitro* (recherche d'adduits à l'ADN, 3 tests des comètes et un test γ -H2AX) et *in vivo* (recherche d'adduits à l'ADN, un test des comètes pour la BTX-2), sur le potentiel d'induction de mutation génique sur un système d'essai bactérien (test d'Ames MPF®) pour la BTX-2, d'induction d'aberrations chromosomiques (AC) *in vitro* pour la BTX-2.

Concernant l'induction d'altérations primaires de l'ADN :

- Les adduits à l'ADN recherchés suite à une exposition à la BTX-2 et la BTX-6 sont exprimés de façon qualitative, en comparant le « rapport d'induction » de la BTX-2 vs la BTX-6. Aucune information quantitative précise (par ex. nombre d'adduits pour 10^7 / 10^8 nucléotides) et aucune comparaison à des groupes non traités n'a été effectuée. Ainsi, les adduits (spécifiques) identifiés constituent une forme d'alerte sur un potentiel génotoxique, et pourraient éventuellement être utilisés comme marqueur d'exposition biologique réelle.
- Les 3 tests des Comètes *in vitro* ont été réalisés sur différentes lignées cellulaires (lymphocytes humains, Jurkat E6-1 et cellules épithéliales pulmonaires humaines) et sur différentes BTX testées à différents niveaux de concentration. Ces essais sont entachés de déviations majeures ce qui ne permet de valider ni les résultats ni leur interprétation. Néanmoins, l'étude de l'induction de fragmentation de l'ADN telle qu'évaluée au travers le test des comètes réalisé sous sa version alcaline (pH>13) pourrait être un des paramètres biologiques sensibles qu'il pourrait être opportun d'étudier pour les BTX, le cas échéant.

De plus, dans une approche de type « poids des preuves » la fragmentation de l'ADN *in vitro* et les adduits à l'ADN *in vitro* et *in vivo* ont un poids faible. Enfin, aucune induction significative de la phosphorylation de l'histone H2AX n'a été démontrée *in vitro* quelle que soit la concentration de BTX-3.

Concernant le potentiel d'induction de mutations géniques, aucune augmentation significative du nombre de colonies révertantes n'a été observée au cours d'une étude d'Ames MPF®. Cependant, les conditions expérimentales de cet essai de screening comportent trop de limites importantes et ne permettent pas de conclure quant au potentiel mutagène de BTX et de son métabolite oxydé BTX-6 sur un système d'essai bactérien. En outre, les résultats « négatifs » ne peuvent pas être considérés comme pertinents.

Dans ces conditions, une étude d'Ames complète utilisant au moins 5 souches bactériennes (e.g., *Salmonella typhimurium* TA 1535, TA1537, TA98, TA100 et TA102 ou *Escherichia coli* WP2 pKm101) devrait être réalisée avec et sans activation métabolique, selon les recommandations de

la ligne directrice OCDE 471. Une attention particulière devra être portée en cas d'un test d'Ames négatif avec une dose maximale analysable <250 µg/boîte. En effet, comme l'indiquent Müller et al (2006)⁶⁰, la plupart des effets mutagènes sont normalement détectables à des niveaux de 250 µg/boîte. Selon Kenyon et al (2007)⁶¹, la limite de sensibilité estimée pour la plupart des mutagènes pertinents dans le test d'Ames est la dose minimale de 250 µg/boîte. Dans ce cas, le test d'Ames devra être considéré comme insuffisamment pertinent, et le potentiel d'induction de mutation génique devra être évalué sur des cellules de mammifères (par exemple, à l'aide du test MLA/TK, OCDE 490).

Concernant le potentiel d'induction d'aberrations chromosomiques, une augmentation significative du nombre d'anomalies chromosomiques a été observée vis-à-vis de cellules CHO-K1-BH4 traitées pendant 48 heures exclusivement à l'IC₅₀. Néanmoins, étant données les conditions expérimentales mises en œuvre dans cette étude, il n'apparaît pas possible de conclure définitivement quant au potentiel d'induction d'aberrations chromosomiques *in vitro* de la BTX-2. De plus, on ne peut pas exclure que l'effet observé soit exclusivement lié à l'instabilité génétique de la lignée cellulaire donc qu'un réel effet clastogène intrinsèque à la BTX-2 existe. Dans ces conditions, une étude d'aberrations chromosomiques complète (préférentiellement le test *in vitro* du micronoyau OCDE TG 487 tel que recommandé par l'Efsa, 2011) devrait être réalisée en utilisant préférentiellement des cellules humaines, stables sur le plan génomique, par exemple des lymphocytes humains. Cette nouvelle étude devrait être réalisée avec et sans activation métabolique et en utilisant des temps de traitement courts et longs sans activation métabolique, selon les recommandations de la ligne directrice.

Il faut également noter que dans l'étude de Murrell et Gibson (2009), les BTX2, BTX3 et BTX6 ont induit une augmentation de l'apoptose vis-à-vis des cellules Jurkat E6-1 à des concentrations inférieures à celles qui ont amené un test des comètes positif. Or, l'apoptose peut être un facteur interférant dans les tests de génotoxicité *in vitro* utilisant des cellules de mammifères (aberrations chromosomiques, micronoyaux et test MLA/TK), et qui peut conduire à des résultats « faussement positifs » (Meintières *et al*, 2001 ; Nessler, 2016)^{62,63}. Dans ces conditions, en cas de positivité dans le test *in vitro* du micronoyau, il pourrait être pertinent de mesurer l'activité apoptogène et évaluer si celle-ci peut être tout ou partie à l'origine de la réponse significative.

III. Conclusion

La revue de la littérature a permis de cibler 9 publications portant sur la mutagenèse et la génotoxicité de brevétoxines. Différents paramètres y ont été évalués : altérations primaires de l'ADN *in vitro* (recherche d'adduits à l'ADN, 3 tests des comètes et un test γ-H2AX) et *in vivo* (recherche d'adduits à l'ADN et un test des comètes pour la BTX-2), mutation génique sur un système d'essai bactérien pour la BTX-2, et aberrations chromosomiques *in vitro* pour la BTX-2.

Tels que synthétisés ci-après, des effets significatifs ont été mis en évidence avec différentes BTX, dans la majorité des systèmes d'essai mis en œuvre :

⁶⁰ Müller L, Mauthe RJ, Riley CM, Andino MM, Antonis DD, Beels C, DeGeorge J, De Knaep AG, Ellison D, Fagerland JA, Frank R, Fritschel B, Galloway S, Harpur E, Humfrey CD, Jacks AS, Jagota N, Mackinnon J, Mohan G, Ness DK, O'Donovan MR, Smith MD, Vudathala G, Yotti L. A rationale for determining, testing, and controlling specific impurities in pharmaceuticals that possess potential for genotoxicity. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2006 Apr;44(3):198-211.

⁶¹ Kenyon MO, Cheung JR, Dobo KL, Ku WW. An evaluation of the sensitivity of the Ames assay to discern low-level mutagenic impurities. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2007 Jun;48(1):75-86.

⁶² Meintières, S., Biola, A., Pallardy, M., Marzin, D., 2001 May. Apoptosis can be a confusing factor in *in vitro* clastogenic assays. *Mutagenesis* 16 (3), 243e250.

⁶³ Nessler F. The current limitations of *in vitro* genotoxicity testing and their relevance to the *in vivo* situation. *Food Chem Toxicol.* 2017 Aug;106(Pt B):609-615.

- BTX-2 et BTX-6 : formation d'adduits à l'ADN avec la cytidine *in vitro* sur cellules pulmonaires de rat (BTX-2 > BTX-6),
- BTX-2 et BTX-6 : formation d'adduits à l'ADN avec l'adénosine et la guanosine *in vivo* dans le tissu pulmonaire de rats mâles exposés par voie intratrachéale (BTX-2 > BTX-6),
- induction de la fragmentation de l'ADN *in vitro* vis-à-vis de lymphocytes humains (BTX2, BTX3 et BTX9), de cellules Jurkat E6-1 (BTX2, BTX3 et BTX6) et de cellules épithéliales pulmonaires humaines (BTX3),
- BTX-2 induction de la fragmentation de l'ADN *in vivo* vis-à-vis du foie de rats mâles exposés par voie intratrachéale,
- BTX-2 et BTX-6 : absence d'augmentation du nombre de révertants vis-à-vis des souches de *Salmonella typhimurium* TA98 et TA100,
- BTX-2 : induction d'aberrations chromosomiques *in vitro* vis-à-vis de CHO-K1-BH4.

Cependant, globalement, les conditions expérimentales de ces essais comportent de nombreuses limites méthodologiques importantes et/ou sont entachées de déviations majeures ce qui ne permet pas de valider les résultats ou d'endosser leur interprétation et ne permettent donc pas de conclure quant au potentiel mutagène et génotoxique des BTX. Les effets cités ci-dessus représentent tout au plus des « alertes » au sens intérêt du (des) paramètres biologiques mesurés.

Ainsi, afin d'obtenir des résultats fiables et consolidés, la stratégie selon une approche par étapes telle que recommandée par l'Efsa (2011) pour la production et l'évaluation des données sur le potentiel génotoxique et mutagène d'une substance doit être mise en œuvre, en commençant par la batterie de base de tests *in vitro* ci-dessous :

- a) un essai de mutation reverse bactérienne (OCDE TG 471), et
- b) un test *in vitro* du micronoyau (OCDE TG 487).

Avec un nombre minimum de tests, cette stratégie permet d'évaluer les événements génétiques majeurs menant potentiellement à la génotoxicité, *i.e.* induction de la mutation génique, aberrations chromosomiques structurelle (clastogénèse) et numérique (aneuploïdie). Ces tests devront être réalisés conformément aux normes internationales, de préférence selon les lignes directrices actuelles de l'OCDE ou le règlement (CE) n° 440/2008 de l'UE sur les méthodes d'essai (UE, 2008).

La (ou les) BTX considérées comme les plus pertinentes en tant que BTX de référence ou d'intérêt devant faire l'objet de cette évaluation restent à être déterminées.

Si les résultats des essais de mutation reverse bactérienne et du micronoyau *in vitro* se révèlent pertinents et clairement négatifs, la conclusion globale sera une absence de potentiel génotoxique et mutagène de la (ou des) BTX investiguées. En outre, une attention particulière devra être portée en cas d'un test d'Ames négatif avec une dose maximale analysable <250µg/boîte correspondant à la limite de détection estimée pour la plupart des mutagènes dans le test d'Ames. Dans ce cas, le test d'Ames devra être considéré comme insuffisamment pertinent, et le potentiel d'induction de mutation génique devra être évalué sur des cellules de mammifères (par exemple, à l'aide du test MLA/TK, OCDE 490). L'implication éventuelle des phénomènes d'apoptose devrait être étudiée dans le cas de résultats significatifs dans le test *in vitro* du micronoyau (ou MLA/TK).

En revanche, des résultats positifs dans l'un (ou dans les 2) essais mis en œuvre, en l'absence de données *in vivo*, la conclusion globale sera l'existence de potentiel génotoxique et mutagène de la BTX concernée. Afin d'infirmer ces résultats, il sera nécessaire de réaliser une étude *in vivo* chez le rongeur en combinant le test du micronucleus sur moelle osseuse et le test des comètes *in vivo* sur les organes cibles définis (par ex., foie et organes du tractus gastro-intestinal).

Références

Gonzalez-Romero. R., V. Suarez-Ulloa, J. Rodriguez-Casariago, D. Garcia-Souto, G. Diaz, A. Smith, J. J. Pasantes, G. Rand, et J. M. Eirin-Lopez. 2017. « Effects of Florida Red Tides on histone variant expression and DNA methylation in the Eastern oyster *Crassostrea virginica* ». *Aquatic Toxicology* 186: 196-204.

Leighfield. T. A., N. Muha. et J. S. Ramsdell. 2009. « Brevetoxin B is a clastogen in rats. but lacks mutagenic potential in the SP-98/100 Ames test ». *Toxicol* 54 (6): 851-56.

Murrell RN et JE Gibson. 2009. « Brevetoxins 2, 3, 6, and 9 show variability in potency and cause significant induction of DNA damage and apoptosis in Jurkat E6-1 cells ». *Archives of Toxicology* 83 (11): 1009-19.

Murrell RN and Gibson JE. Brevetoxin 2 alters expression of apoptotic. DNA damage. and cytokine genes in Jurkat cells ». *Hum Exp Toxicol* 2011 Mar;30(3):182-91.

OCDE. 2016. « Test des Comètes in vivo en Conditions Alcalines sur Cellules de Mammifères ». Organisation de Coopération et de Développement Economiques. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. no 489.

Phillips, Ayanna Carla Natasha. 2009. « Molecular responses of normal and neoplastic epithelial cells to brevetoxin-3 (PbTx-3) exposure ». University of Florida.

Plakas, SMZ. Wang, KR. El Said, ELE, Jester. HR. Granade. L. Flewelling. P. Scott. et R. W. Dickey. 2004. « Brevetoxin metabolism and elimination in the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) after controlled exposures to *Karenia brevis* ». *Toxicol* 44 (6): 677-85.

Radwan. FFY. et J. S. Ramsdell. 2008. « Brevetoxin forms covalent DNA adducts in rat lung following intratracheal exposure ». *Environmental Health Perspectives* 116 (7): 930-36.

Radwan. F. F. Y., Z. Wang. et J. S. Ramsdell. 2005. « Identification of a rapid detoxification mechanism for brevetoxin in rats ». *Toxicological Sciences* 85 (2): 839-46.

Sayer. A.. Q. Hu. A. J. Bourdelais. D. G. Baden. et J. E. Gibson. 2005. « The effect of brevenal on brevetoxin-induced DNA damage in human lymphocytes ». *Archives of Toxicology* 79 (11): 683-88.

Sayer. A. N.. Q. Hu. A. J. Bourdelais. D. G. Baden. et J. E. Gibson. 2006. « The inhibition of CHO-K1-BH4 cell proliferation and induction of chromosomal aberrations by brevetoxins in vitro ». *Food and Chemical Toxicology* 44 (7): 1082-91.

Wang Z. et JS. Ramsdell, 2011 « Analysis of interactions of brevetoxin-B and human serum albumin by liquid chromatography/mass spectrometry ». *Chemical Research in Toxicology* 24 (1): 54-64.

Tableau 6 : Tail moments des cellules épithéliales bronchiques humaines après exposition à BTX-3 (d'après Phillips, 2009)

Traitement	N	Tail Moment (Mean± SE)
Contrôle négatif (HBSS)	154	6,05 ± 1.14
BEAS-2B		
Contrôle positif (0,75% H2O2)	141	53,98 ± 3,34 *
10 ng/ml PbTx-3	128	8,89 ± 0,82
100 ng/ml PbTx-3	115	12,62 ± 1,42 *
500 ng/ml PbTx-3	117	6,81 ± 0,93
H460		
Negative control (HBSS)	238	0,30 ± 0,08
Positive control (3% H2O2)	14	62,56 ± 1,14 *
10 ng/ml PbTx-3	177	11,16 ± 1,06 *
100 ng/ml PbTx-3	208	0,13 ± 0,02
500 ng/ml PbTx-3	153	0,21 ± 0,05

* Significativement différent du contrôle négatif. p < 0,05 (Wilcoxon)

Annexe 6 : Occurrences des microalgues dans le monde

■ *Chattonella*

Lien vers les données :

https://www.gbif.org/occurrence/search?taxon_key=3194434&occurrence_status=present

■ *Fibrocapsa*

Lien vers les données :

https://www.gbif.org/occurrence/search?q=fibrocapsa&occurrence_status=present

■ *Fibrocapsa japonica*

Lien vers les données :

https://www.gbif.org/occurrence/search?taxon_key=3194429&occurrence_status=present

■ *Heterosigma*

Lien vers les données :

https://www.gbif.org/occurrence/search?q=Heterosigma&occurrence_status=present

■ *Heterosigma akashiwo*

Lien vers les données :

https://www.gbif.org/occurrence/search?taxon_key=3194420&advanced=1&occurrence_status=present

■ *Karenia*

Lien vers les données :

https://www.gbif.org/occurrence/search?q=karenia&taxon_key=7662144&occurrence_status=present

Tout ce qui est référencé comme des *Karenia*, inclut donc les données Quadrigé renseignées comme *K. brevis* + papilionacea

■ *Karenia brevis*

Lien vers les données :

https://www.gbif.org/occurrence/search?offset=0&q=%22karenia%20brevis%22&taxon_key=7662144&advanced=1&verbatim_scientific_name=%22Karenia%20brevis%22&occurrence_status=present

Karenia brevis n'est pas une espèce existante dans GBIF. Cette carte a donc été créée en faisant un filtre « *Karenia brevis* » sur la propriété « verbatim scientific name » => 180 occurrences. La représentativité est possiblement sous estimée

■ *Karenia brevisulcata*

Lien vers les données :

https://www.gbif.org/occurrence/map?taxon_key=5424504&occurrence_status=present

■ *Karenia bicuneiformis*

Lien vers les données :

https://www.gbif.org/occurrence/search?q=karenia%20bicuneiformis&advanced=1&verbatim_scientific_name=karenia%20bicuneiformis&occurrence_status=present

Karenia bicuneiformis n'est pas une espèce existante dans GBIF. Cette carte a donc été créée en faisant un filtre « *Karenia bicuneiformis* » sur la propriété « verbatim scientific name » => 70 occurrences. La représentativité est possiblement sous estimée, il manque par exemple des données en Afrique du Sud

/ !\ 5 occurrences renseignées sous *K. bidigitata* en Nouvelle Zelande

https://www.gbif.org/occurrence/map?q=karenia%20bidigitata&advanced=1&verbatim_scientific_name=Karenia%20bidigitata&occurrence_status=present

■ ***Karenia papilionacea***

Attention données comme étant indiquées comme « formellement » des *K. papilionacea*

On ne retrouve donc pas les données de Quadridge (identifiées comme *K. brevis* ou *papilionacea*)

Lien vers les données :

https://www.gbif.org/occurrence/map?q=karenia%20brevis&taxon_key=8232388&occurrence_status=present

■ ***Karenia mikimotoi***

Lien vers les données :

https://www.gbif.org/occurrence/map?q=karenia&taxon_key=7454879&occurrence_status=present

■ ***Karenia selliformis***

Lien vers les données :

https://www.gbif.org/occurrence/map?q=karenia%20selliformis&advanced=1&verbatim_scientific_name=karenia%20selliformis&occurrence_status=present

■ ***Karenia umbella***

Lien vers les données :

https://www.gbif.org/occurrence/search?q=Karenia%20umbella&advanced=1&verbatim_scientific_name=Karenia%20umbella

Occurrences enregistrées à *Karenia umbella*, pas d'occurrence à *Karenia longicanalis*

Annexe 7 : Suivi des actualisations du rapport

Date	Page	Description de la modification
Février 2021		Première version du rapport
Décembre 2021	1	Le titre du rapport a été complété pour y inclure la partie relative à l'exposition via les activités aquatiques et les aérosols.
	2	§ <u>citation suggérée</u> : la citation a été complétée pour ajouter les éléments relatifs à l'exposition via les activités aquatiques et les eaux récréatives § <u>mots clés</u> : les mots clés relatifs aux eaux de baignades et aux aérosols ont été ajoutés
	3-4	Les noms des rapporteurs qui ont participé à l'expertise de la question 5 ⁶⁴
	5-7	Les noms des membres du CES « Eaux » et de la coordination de la question 5 sont ajoutés aux rapports
	11-12	Les acronymes cités dans la réponse à la question 5 sont ajoutés dans le tableau des acronymes (FAO, HAEDAT, MOTE, OBIS)
	17	Les éléments d'organisation de la réponse à la question 5 sont ajoutés au paragraphe « modalités de traitement de la saisine ».
	18-19	§ 1.5.2 : Revue bibliographique pour la question 5. Ce paragraphe décrit la méthodologie suivie pour réaliser la revue bibliographique de la question 5.
	19-20	§ Voies d'exposition pour l'Homme. Les éléments relatifs à la question 5 complètent le § 1.6
	31	Tableau 3 : Synthèse des informations identifiées par le GT Désoxy-BTX-B2 et Sulfoxyde-BTX-B2 ont été supprimés du tableau.
	38	Le paragraphe relatif à l'analyse des aérosols est complété
	50	2.4 Recommandations du GT pour les méthodes analytiques Désoxy-BTX-B2 et Sulfoxyde-BTX-B2 ont été supprimés de la liste. BTX-B4(a et b) a été ajouté.
	55	Le paragraphe « production de métabolites/toxines » est complété
	56	Le paragraphe « répartition géographique » est complété
	68	La légende de la Figure 28 a été corrigée
	72	La légende de la Figure 32 a été corrigée
	74	Le § 3.4 « élimination des efflorescences » est ajouté au rapport initial.

⁶⁴ Dans l'ensemble du tableau, les termes « question 5 » se rapportent à l'expertise relative aux risques liés à l'exposition aux brevétoxines *via* les eaux de baignade contaminées et les aérosols contaminés

	83	§ 4.4.1 données toxico-cinétiques. Le paragraphe est complété avec des éléments d'information relatifs à l'exposition de mammifères à des brevétoxines par inhalation
	88	§ 4.4.4 « toxicité par voie respiratoire ». Ce paragraphe est ajouté au rapport initial.
	98	§ 4.5.2 « exposition par inhalation ». Ce paragraphe est ajouté au rapport initial.
	101	Le § « impact économique » est ajouté au rapport initial.
	102	Le § 4.5.3 « Exposition par ingestion d'eau ou contact cutané lors de la baignade » est complété.
	109	Au § 6.1 « Eau » des éléments complémentaires permettant de répondre à la question 5, sont ajoutés au paragraphe initial.
	110	Le § 6.2 « aérosols » est complété.
	111	Le § 6.3 « eau de pluie et sable » est ajouté au rapport initial.
	118	Le titre du § 7.1.2.3 « surveillance des aérosols » est modifié et devient « surveillance des aérosols et des eaux ». Le paragraphe complété avec des éléments permettant de répondre à la question 5.
	121	Le § 7.2 « Afrique du Sud » est ajouté au rapport initial.
	121	Le § 7.3 « Australie et Nouvelle Zélande » est complété avec des éléments permettant de répondre à la question 5.
	123	Le § 7.4 « Mexique » est complété avec des éléments permettant de répondre à la question 5.
	123	Le § 7.4.1.1 « Surveillance des microalgues en France métropolitaine » est complété avec des éléments permettant de répondre à la question 5.
	124	Modification des images et de la légende de la Figure 40
	126	Modification des images, de la légende et des renvois dans le texte de la Figure 42
	134	Mise à jour des données du graphique, de la légende et des renvois dans le texte de la Figure 49 Le § 7.6 « Autres pays européens » est complété avec des éléments permettant de répondre à la question 5.
	138	7.6.3 Recommandations sur la stratégie analytique dans les coquillages Désoxy-BTX-B2 et Sulfoxyde-BTX-B2 ont été supprimés de la liste. BTX-B4(a et b) a été ajouté.
	138	Le § 7.7.5 « recommandations de surveillance épidémiologique » est complété avec des éléments permettant de répondre à la question 5.
	139	8 Conclusions du groupe de travail Désoxy-BTX-B2 et Sulfoxyde-BTX-B2 ont été supprimés de la liste. BTX-B4(a et b) a été ajouté.
	142	Désoxy-BTX-B2 et Sulfoxyde-BTX-B2 ont été supprimés de la liste. BTX-B4(a et b) a été ajouté.

	143	Les conclusions et recommandations de la question 5 sont ajoutées dans le rapport initial
	145	Le § 9 « besoins de recherche » est complété avec des éléments permettant de répondre à la question 5.
	148	Le § 10.1 « Bibliographie pour les questions 1 à 4 » ont été mises à jour.
	172	Le § 10.2 « Bibliographie pour la question 5 » est ajouté au rapport initial.
	187	L'annexe 4 « Formation des aérosols » est ajoutée au rapport initial.
	208	L'annexe 7 « Suivi des actualisation du rapport » est ajoutée au rapport initial.



anses

CONNAÎTRE, ÉVALUER, PROTÉGER

AGENCE NATIONALE DE SÉCURITÉ SANITAIRE
de l'alimentation, de l'environnement et du travail

14 rue Pierre et Marie Curie 94701 Maisons-Alfort Cedex
Tél : 01 42 76 40 40
www.anses.fr — @Anses_fr