

Maisons-Alfort, le 27 octobre 2006

AVIS

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'évaluation du dispositif de surveillance du milieu et à l'évaluation du risque lié à la consommation des coquillages, notamment dans la situation du bassin d'Arcachon

LA DIRECTRICE GÉNÉRALE

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 16 septembre 2006 par le Ministère de la Santé et des Solidarités, le Ministère de l'Agriculture et de la Pêche et le Ministère de l'Economie, des Finances et de l'Industrie d'une demande d'avis portant sur :

- l'évaluation du dispositif de surveillance du milieu et d'évaluation du risque lié à la consommation des coquillages, en prenant en compte les caractéristiques environnementales complexes du bassin d'Arcachon ;
- des recommandations sur le dispositif général de la gestion de la sécurité sanitaire des coquillages. Dans l'éventualité où les investigations en cours s'orienteraient vers l'identification d'un agent infectieux, l'Agence est invitée à formuler des recommandations répondant à cette éventualité tant pour le dispositif général que pour le bassin d'Arcachon, notamment en ce qui concerne le fonctionnement des "stockages protégés".

Devant la détection de *Vibrio parahaemolyticus*, sur des prélèvements d'huîtres effectués le 8 septembre 2006 dans le Bassin d'Arcachon, l'Afssa a en outre été saisie le 5 octobre 2006 sur les questions complémentaires suivantes :

- Evaluation de la pathogénicité de ce vibrio ;
- Interprétation des résultats positifs des bio-essais chez la souris dans ce contexte de présence de *Vibrio parahaemolyticus* ;
- Recommandations sur les mesures de gestion permettant de maîtriser ce risque sanitaire potentiel.

Méthode d'expertise et questions instruites

Le groupe d'expertise collective d'urgence (GECU) « Biotoxines Marines » créé par décision de la Directrice générale de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments, en concertation avec le président du Comité d'experts spécialisé « Résidus et Contaminants Chimiques et Physiques » a été chargé de mener cette expertise.

I- S'agissant du danger « Phycotoxines »

Cinq questions ont été identifiées pour répondre à la saisine du 16 septembre 2006 :

- 1) Elaborer la cartographie du bassin d'Arcachon et en tirer des enseignements au regard de la compréhension des phénomènes locaux phycotoxiniques ;
- 2) Procéder à une analyse historique des événements de contamination liés aux phycotoxines marines à Arcachon et à une analyse analogique avec d'autres événements liés aux phycotoxines lipophiles ;
- 3) Procéder à une analyse critique du dispositif actuellement en place tout au long de la filière et jusqu'à la remise au consommateur, au regard des réglementations européenne et nationale et émettre, si nécessaire, des recommandations sur l'évolution souhaitable du dispositif ;

4) Conduire une réflexion permettant de préciser les apports et les limites de l'utilisation du « bio-essai souris » dans un objectif de protection de la santé du consommateur à l'égard des phycotoxines lipophiles, que ce soit dans un cadre de surveillance ou de vigilance ;

5) Examiner les données épidémiologiques disponibles relatives aux événements de contamination phycotoxinique des coquillages.

Pour l'ensemble de ces questions, des recommandations ont été émises si nécessaire.

II- S'agissant du danger « *Vibrio* »

L'Afssa s'est auto-saisie de 2 questions additionnelles à celles figurant dans la saisine inter ministérielle du 5 octobre 2006 :

1) Y-a-t-il une pertinence scientifique à surveiller mensuellement la détection de *Vibrio parahaemolyticus* au niveau des coquillages et du milieu du Bassin d'Arcachon dans le but de suivre l'évolution de cette présence bactérienne ?

2) Y-a-t-il une pertinence scientifique à proposer la mise en place d'une étude pilote au printemps prochain visant à rechercher la présence de *Vibrio parahaemolyticus* dans le Bassin d'Arcachon, à évaluer son éventuel degré d'implantation dans l'environnement et, en cas de présence, à rechercher la présence des gènes d'hémolysines ?

S'agissant des phycotoxines, la question 4 du présent avis relative aux tests a été présentée au Comité d'experts spécialisés « Résidus et Contaminants Chimiques et Physiques » lors de sa séance du 18 octobre 2006. Les autres questions ont été validées par le Groupe d'expertise collective d'urgence (GECU). L'expertise des questions relatives à *Vibrio* s'est appuyée sur 3 experts extérieurs au GECU.

Un rapport scientifique complète le présent avis et figure en annexe 4.

Champ de l'expertise

L'instruction de cette double saisine est centrée sur les aspects liés aux toxines de micro-algues et à *Vibrio parahaemolyticus*.

Un avis complémentaire sera rendu par l'Afssa sur les aspects concernant les autres agents microbiologiques et les contaminants physico-chimiques.

Schéma général du dispositif de sécurisation lié à la consommation de coquillages en France

Cf. annexe 1

Principales définitions

Bassin des établissements conchylicoles (bassin de stockage, bassin dégorgeoir, bassin de finition ou bassin de purification)

Ce sont des bassins cimentés et étanches dans lesquels les coquillages destinés à la consommation humaine sont ré-immersés (retrempés) pour les opérations : de purification bactériologique (coquillages provenant de zone B), de finition (opération permettant aux coquillages, en dégorgeant, de se débarrasser des boues, vase, sable et mucus) ou de simple stockage dans l'attente de leur conditionnement (pour préserver leur qualité organoleptique et assurer un bon état de vitalité).

Bio-essai / test souris et son interprétation

Le bio-essai sur souris pour les phycotoxines lipophiles associe la préparation d'un extrait liposoluble semi-purifié par des solvants organiques et l'injection de cet extrait par voie intrapéritonéale (voie i.p.) à des souris selon un protocole chimique et biologique défini pour

contrôler une seule dose correspondant à la valeur du seuil de salubrité. Ainsi, au sens réglementaire :

- Un bio-essai sur souris est négatif si le résultat montre 0 ou 1 souris morte sur les 3 souris injectées dans un délai de 24h après l'injection. Cela signifie que les coquillages sont soit exempts de toxines lipophiles, soit en contiennent des quantités inférieures au seuil de salubrité. Ils sont conformes par rapport au seuil réglementaire et donc sont consommables ;
- Un bio-essai sur souris est positif si le résultat montre 2 ou 3 souris mortes sur les 3 souris injectées dans un délai de 24h après l'injection. Cela signifie que les coquillages contiennent des quantités de toxines lipophiles supérieures au seuil de salubrité. Ils sont non conformes par rapport au seuil réglementaire et donc sont impropres à la consommation.

Classement des zones de production conchycolles (par 100 g de chair et liquide intra-valvaire) :

- Zone A : commercialisation directe possible si *E. coli* < 230 ;
- Zone B : commercialisation après passage en bassin de purification si *E. coli* < 4600 de telle sorte qu'après passage en bassin de purification le niveau d'*E. coli* soit < 230 ;
- Zone C : *E. coli* < 46 000, reparcage de longue durée des coquillages dans des zones de qualité A de telle sorte qu'après reparcage le niveau d'*E. coli* soit < 230 (cette situation n'existe pas en France) ;
- Zone D : *E. coli* > 46 000, commercialisation interdite ;

Le classement des zones prend également en compte la contamination par les métaux lourds. Ainsi, une concentration en plomb, cadmium ou mercure dans les coquillages supérieure au seuil fixé par le règlement (CE) n°466/2001 à 1,5 mg/kg en poids humide pour le plomb, 1 mg/kg en poids humide pour le cadmium et 0,5 mg/kg en poids humide pour le mercure entraîne un classement en zone D, quelle que soit la valeur du critère microbiologique.

Détoxification

Opération permettant de décontaminer, dans les bassins des établissements, les coquillages contaminés par des toxines, selon des modalités à déterminer.

Etablissement d'expédition

Tout établissement dont l'activité est dédiée à la réception, à la finition, au lavage, au nettoyage, au calibrage, au conditionnement et à l'emballage des coquillages vivants propres à la consommation humaine.

Flores phytoplanctoniques :

- Les flores totales, effectuées régulièrement toute l'année, sur 29 points RePHY répartis sur tout le littoral français, dénombrent tous les taxons reconnaissables ;
- Les flores partielles indicatrices, effectuées régulièrement toute l'année ou pendant la période productive, sur 83 points, dénombrent une liste minimale obligatoire de taxons constituée (i) des genres toxiques pour le consommateur (*Alexandrium*, *Dinophysis*, *Pseudo-nitzschia*), quelle que soit leur concentration, (ii) de toutes les espèces présentes à une concentration supérieure à 100 000 cellules par litre, toxiques ou non ;
- Les flores partielles toxiques, pouvant être effectuées sur un potentiel de 80 points supplémentaires, dénombrent les genres toxiques pour le consommateur.

Les flores totales fournissent une connaissance satisfaisante de la distribution spatiale et des variations temporelles des divers taxons phytoplanctoniques le long des côtes françaises. Les données des flores partielles indicatrices et partielles toxiques sont utilisées en complément des flores totales, l'ensemble des deux pouvant répondre à différents objectifs : (i) élaborer des indicateurs de type efflorescences phytoplanctoniques, (ii) suivre les développements d'espèces toxiques ou nuisibles pour les animaux marins ; (iii) évaluer l'état d'eutrophisation ; (iv) permettre sur un plan sanitaire, le suivi de toutes les espèces toxiques ou potentiellement toxiques pour le consommateur, connues ou émergentes.

Malines

Ce sont des réserves d'eau permettant d'approvisionner en eau de mer certains établissements conchylicoles du Bassin d'Arcachon. Elles peuvent être à usage collectif ou individuel. Les malines sont remplies avec de l'eau provenant du Bassin d'Arcachon, à marée haute, soit passivement (écluse ou tuyau à clapet), soit activement (mécanisme de pompes). Les malines peuvent également servir de zone de stockage de coquillages de production, dans l'attente de leur expédition pour la consommation humaine par l'intermédiaire d'un établissement conchylicole.

Phycotoxines hydrophiles

Ce sont des phycotoxines polaires pouvant être solubilisées en milieu aqueux. Les deux principales familles de phycotoxines hydrophiles sont :

- la famille des phycotoxines paralysantes (famille de la saxitoxine) et
- la famille des toxines amnésiantes (famille de l'acide domoïque).

Ces 2 familles sont réglementées pour le risque d'intoxication neurotoxique qu'elles représentent pour l'homme.

Phycotoxines lipophiles

Ce sont des phycotoxines moyennement polaires à apolaires ayant une affinité pour les solvants organiques de polarité correspondante. Elles ont été regroupées dans une même catégorie car elles possèdent des propriétés physico-chimiques voisines mais présentent des activités biologiques diverses.

Les phycotoxines lipophiles sont composées :

- de toxines qui se sont avérées responsables d'un syndrome diarrhéique chez l'homme : il s'agit de la famille de l'Acide Okadaïque et des Dinophysistoxines (AO+DTXs) et de la famille des Azaspiracides (AZAs) ;
- de toxines pour lesquelles le risque chez l'homme est mal connu mais a été évalué à partir de données toxicologiques expérimentales chez l'animal chez lequel elles se sont révélées cardiotoxiques à forte dose : famille des Yessotoxines (YTXs) ou hépatotoxiques : famille des Pecténotoxines (PTXs).
- Depuis ces dernières années, de nouvelles toxines lipophiles ont été identifiées, en partie à travers leur action neurotoxique létale très rapide chez les souris par voie intrapéritonéale dans le cadre du bio-essai sur souris dans lequel elles se révèlent. Les effets toxiques chez l'homme ne sont pas connus et, à ce jour, aucun cas clinique n'a pu leur être imputé. Les neurotoxines à action rapide (ou « Fast Acting Toxins », FAT) forment un groupe comprenant les spirolides (SPXs), les gymnodimines, les pinnatoxines, les pteriatoxines et les prorocontrolides. Elles ne sont soumises à aucun contrôle tant dans la réglementation communautaire que dans la réglementation nationale. Il a été montré que les gymnodimines et les spirolides sont bioaccumulables dans les coquillages, tandis que pour les autres, nous ne disposons pas de données. Ces toxines sont rapportées dans un nombre croissant de pays (Canada, Norvège, France, Nouvelle Zélande, Tunisie...).

Phytoplancton

Il est composé de l'ensemble des micro-algues qui flottent passivement dans les eaux et dont se nourrissent les coquillages. C'est un élément fondamental des chaînes alimentaires. Certaines espèces phytoplanctoniques produisent des toxines, appelées phycotoxines (toxines d'algues) ou encore biotoxines marines. Certaines d'entre elles sont dangereuses pour le consommateur, quand elles s'accumulent dans les coquillages. D'autres sont libérées dans l'eau de mer et sont dangereuses pour la faune marine et parfois pour l'homme.

Purification

Opération permettant d'éliminer les bactéries présentes dans les coquillages à des teneurs supérieures au seuil de salubrité. Cette opération de re-immersion est obligatoire pour traiter les coquillages provenant de zone classée B, avant de les mettre sur le marché pour la consommation humaine. Elle a lieu dans des établissements agréés pour la purification.

Représentativité en matière de phycotoxicité

Un échantillon est dit représentatif quand il fournit une estimation non biaisée de la statistique utilisée (par exemple une moyenne). Cette notion de représentativité est liée à la variable retenue et à l'échelle à laquelle l'estimation est réalisée. S'agissant de la phycotoxicité dans les coquillages du bassin d'Arcachon appréciée au travers du bio-essai souris, un échantillonnage constitué par plusieurs prélèvements dans différentes parties du bassin sera considéré comme représentatif s'il rend compte efficacement de la toxicité dans le bassin. A contrario il serait non représentatif si par exemple un secteur réellement touché par la toxicité était écarté du plan d'échantillonnage. Cette notion de représentativité est applicable à des échelles spatiales plus fines, comme au voisinage d'un point de surveillance du Réphy, mais également dans le temps si par exemple un événement de toxicité survenait sans que la période considérée ne fasse l'objet d'une surveillance.

REMI

Réseau de surveillance microbiologique de l'Ifremer.

Réseau de laboratoires

Deux réseaux de laboratoires coexistent actuellement : l'un destiné à l'investigation du milieu, l'autre à la surveillance des conditions de mise sur le marché des coquillages .

- Le réseau de l'Ifremer comprend 9 laboratoires implantés sur 12 sites, dont 7 sont des laboratoires d'analyses des phycotoxines. Sur ces 7 laboratoires, 3 sont à ce jour accrédités pour la recherche de phycotoxines, 4 ne le sont pas encore. Environ 1000 analyses sont réalisées par an ;
- Le réseau des laboratoires vétérinaires départementaux comprend 4 laboratoires accrédités pour la recherche de phycotoxines lipophiles. Environ 500 analyses sont réalisées par an essentiellement dans le cadre des plans de surveillance (et parfois d'auto-contrôles).

Réphy

Réseau de Surveillance du Phytoplancton et des Phycotoxines de l'Ifremer.

Seuil de salubrité

Concentration en toxines dans les coquillages au delà de laquelle on considère que ceux-ci deviennent impropres à la consommation

Surveillance

Opérations de contrôle des niveaux de contamination des coquillages en phycotoxines mis en œuvre pour garantir le respect des exigences de la réglementation ; elle cible le contrôle des toxines connues réglementées

Toxicité atypique

Episode de contamination des coquillages, révélé à travers une réponse toxique chez la souris en injection intrapéritonéale (ip), dont l'origine ne peut pas être expliquée par la présence des toxines connues habituellement recherchées.

Vigilance

Opérations de mesure de l'émergence de nouvelles phycotoxines présentant un risque potentiel pour le consommateur

Zones et périodes dites à risque (définitions valables pour la présence de *Dinophysis*¹ essentiellement)

Les zones à risque sont les zones qui ont été touchées au moins une fois par la présence de toxines dans les coquillages à des concentrations supérieures au seuil de salubrité, sur une période de référence définie comme étant les six dernières années d'observation. La notion de zone à risque est définie pour une famille de toxines : on parlera par exemple de zone à risque

¹ *Dinophysis* est le genre producteur de phycotoxines suivantes : famille de l'acide okadaïque et dinophysistoxines (AO/DTX) et des pectenotoxines (PTX).

toxines lipophiles. Pour chacune des zones à risque, et pour une famille de toxines, la période à risque recouvre l'ensemble des mois concernés par la présence de ces toxines. Les zones à risque et les périodes à risque sont actualisées annuellement. Ces définitions sont indépendantes des périodes de forte consommation.

Problématique « Phycotoxines »

I- Elaborer la cartographie du bassin d'Arcachon et en tirer des enseignements au regard de la compréhension des phénomènes locaux phycotoxiniques

L'analyse conduite dans le rapport joint permet de tirer les deux conclusions suivantes :

1- S'agissant de la notion de sectorisation du Bassin d'Arcachon

Le 25 mai 2005, à la demande du cabinet du MAP, une réunion regroupant les administrations concernées (DGS, DGCCRF, DGAI, DPMA), l'Ifremer et l'Afssa a été organisée dans le but d'examiner la pertinence scientifique d'une telle mesure. Les critères évoqués à cette occasion ont été repris par la DPMA afin de conditionner cette possibilité au respect des trois critères suivants : (i) une validation scientifique sur sa faisabilité et la fixation des limites de zones ; (ii) une traçabilité fiable et (iii) des contrôles renforcés. L'Ifremer, interrogé conjointement par la DGAI et la DPMA sur la première condition, a rendu un avis le 30 août 2006 qui concluait à l'absence de pertinence scientifique d'une telle démarche. Cette position est d'ailleurs renforcée par les résultats d'une simulation, concernant *Dinophysis*, réalisée dans les conditions de marée et de vent de la crise de 2005 (cf. rapport joint).

2- S'agissant de la classification des zones

La procédure de classification en zone A, B, C et D repose sur un critère microbiologique de contamination fécale illustré par le dénombrement d'*E. coli* et sur les concentrations en plomb, mercure et cadmium. Cette classification est sous la responsabilité du Préfet du département qui prend un arrêté de classement sur la base d'une proposition du DDAM après avis du DDASS.

Actuellement, trois types d'interrogation se posent à propos de ce critère de contamination fécale et concernent :

- La pertinence scientifique d'accepter une tolérance autour de la valeur seuil actuellement reconnue pour la zone A qui est fixée à moins de 230 *E. coli* pour 100 g de chair et liquide intravalvaire) La Commission européenne examine cette question et devrait saisir l'AESA² ;
- Dans certaines situations, le critère *E. coli* a pu être mis en défaut notamment en cas de contamination virale. Des critères alternatifs et/ou complémentaires, reposant sur la présence d'autres marqueurs tels que les bactériophages, ont été proposés en raison du poids potentiel des contaminations virales de ces zones de pêche. Mais des résultats contradictoires rapportés sur le sujet ont conduit à l'abandon de ce critère dans le règlement communautaire fixant les critères microbiologiques de surveillance pour les mollusques bivalves vivants ;
- La question de l'existence ou non d'une corrélation ou d'une superposition des zones classées au regard du critère de contamination fécale avec celles investiguées préférentiellement pour la recherche de toxines de micro-algues. La répartition actuelle des points de prélèvements du RePHY et du REMI ne permet pas de répondre à cette question. D'après les informations transmises à l'Afssa par l'Ifremer,

² Il est à noter que pour le classement des zones B, une telle tolérance a été acceptée puisque 10% des résultats pourront désormais dépasser la valeur seuil de 4600 *E. coli* (règlement en cours de finalisation).

le risque phycotoxinique étant d'origine phytoplanctonique, le positionnement des points du RePHY est à distinguer du positionnement des points du REMI dont la localisation est dépendante de la proximité des sources de contamination en provenance des bassins versants.

La superposition des points RePHY et REMI est d'environ 50 % relativement au dispositif RePHY. L'objectif actuel de ce dispositif n'est pas la superposition des points des 2 réseaux parce que l'hypothèse retenue est qu'il n'y aurait pas de relation directe entre les risques de contamination fécale et phycotoxinique. Cette superposition de 50 % n'est motivée actuellement que par des contraintes logistiques d'accès aux coquillages. Les points RePHY n'appartenant pas au REMI sont pour la plupart des points plus éloignés de la côte, tels que les points sur les gisements de pectinidés au large.

Le lien semble trop indirect aux experts pour qu'une contamination microbiologique puisse constituer un signal d'alerte à l'apparition d'une contamination phycotoxinique.

→ **Conclusions et recommandations au regard des enseignements que l'on peut tirer de la cartographie du Bassin d'Arcachon.**

- 1- La décision de sectoriser le Bassin d'Arcachon, en période de contamination phycotoxinique, quelle qu'en soit la nature, n'a pas lieu d'être mise en œuvre puisqu'aucune justification scientifique ne sous-tend cette mesure de gestion ;
- 2- Le critère de contamination fécale *E. coli* retenu pour le classement des zones de production n'est pas infaillible (d'autant que des tolérances par rapport aux valeurs seuil sont acceptées). Il convient de mettre en œuvre des travaux pour identifier des indicateurs complémentaires à *E. coli*³ ;
- 3- Le fait qu'une contamination microbiologique puisse constituer un signal d'alerte à l'apparition d'une contamination phycotoxinique n'est actuellement appuyée par aucune hypothèse scientifique solide.

II- Procéder à une analyse historique des événements de contamination liés aux phycotoxines marines à Arcachon et à une analyse analogique avec d'autres événements liés aux phycotoxines lipophiles

L'expertise s'est appuyée sur des données historiques fournies par l'Ifremer. L'ensemble des données brutes est disponible mais ces données ont été fournies de façon synthétique, compte tenu du délai imparti pour mener l'analyse. Il conviendra de récupérer ces informations pour analyse complémentaire.

Dans les limites des données transmises à l'Agence, il ressort de cette analyse les points suivants :

1- S'agissant de l'historique des contaminations par des phycotoxines marines dans le bassin d'Arcachon, dont les épisodes de toxicité atypique observés sur la région

Au préalable, il convient de souligner que la méthode du bio-essai sur souris a largement évolué depuis la mise en place de la surveillance des phycotoxines dans le but d'accroître la spécificité de détection des toxines lipophiles. Ce constat doit être pris en considération pour l'interprétation de ces résultats en termes de tendance.

On identifie deux périodes distinctes :

- Une première période allant de 1992 à 1994, pendant laquelle se sont succédés des épisodes de toxicité non liés à *Dinophysis*, qui ont été ultérieurement expliqués par la

³ Entre autres, le rapport Virus de l'Afssa en cours de finalisation qui évoque la question des indicateurs.

présence de traces de phycotoxines paralysantes interférant avec le test souris pour les toxines lipophiles,

- Une deuxième période en 1995 puis de 2000 à 2006, pendant laquelle il a été observé (i) des épisodes de contamination des coquillages par les phycotoxines diarrhéiques (AO/DTX) et la présence de *Dinophysis* ; (ii) en 2005 : une succession de plusieurs types de contamination expliqués par la présence des phycotoxines (AO-DTXs) et/ou PTXs et/ou spirolides (SPX) avec présence de leurs producteurs dans l'eau (*Dinophysis* ou *Alexandrium ostenfeldii*) ; (iii) des épisodes de contamination par les phycotoxines paralysantes sans détection de phytoplancton producteur dans l'eau en 2002 et 2003 et (iv) des événements de toxicité atypique en 2005 et 2006 encore inexpliqués.

Par ailleurs, il peut être souligné que les décisions de gestion en termes de fermeture / ouverture du Bassin d'Arcachon n'ont pas toujours été en cohérence avec les résultats des tests utilisés (cf. annexe 1 du rapport joint). En effet, des situations de non fermeture ont pu être observées sur le Bassin en dépit de bio-essais sur souris positifs.

2- S'agissant des espèces phytoplanctoniques et de leur lien avec les toxines

Pour Arcachon, 4 types de situations ont été observés :

- Des épisodes de contamination par les phycotoxines lipophiles (AO-DTXs, PTXs) en lien avec la présence de *Dinophysis* ;
- Des épisodes de contamination par de nouvelles phycotoxines lipophiles (spirolides ou SPXs) en lien avec la présence de *Alexandrium ostenfeldii* ;
- Des épisodes de toxicité atypique par des substances lipophiles non identifiées et qui restent inexpliqués ;
- Des épisodes de contamination par les phycotoxines paralysantes sans avoir détecté une espèce phytoplanctonique connue potentiellement responsable. Arcachon est le seul cas de ce type répertorié sur le littoral français.

Ainsi, la responsabilité de *Dinophysis* dans les événements de contamination des coquillages par les phycotoxines diarrhéiques (AO-DTXs) semble indiscutable. En revanche, les épisodes de contamination par les phycotoxines paralysantes ne sont pas toujours expliqués par la présence d'une espèce connue de phytoplancton producteur de toxines paralysantes. Les épisodes de toxicité atypique récents de 2006 et 2006 ne sont pas non plus explicitement liés à une ou plusieurs espèces.

Il n'est donc pas possible à l'heure actuelle de conclure sur ce sujet. Toutefois, suite à une saisine du Ministre de l'Agriculture et de la Pêche de juin 2006, l'Afssa pilote un programme de recherche⁴ visant à déterminer les causes de la toxicité non expliquée dans les coquillages du Bassin.

3- S'agissant de l'analyse analogique avec d'autres événements de toxicité atypique liés aux tests souris pour les phycotoxines lipophiles sur l'ensemble du littoral français

Dans un certain nombre de cas, ces événements ont pu être expliqués ultérieurement, par exemple par des interférences avec les phycotoxines paralysantes lors de la réalisation du test des toxines diarrhéiques (à une époque où l'extraction utilisée pour le test n'était pas assez spécifique). La plupart de ces événements restent toutefois inexpliqués, mais la détection ultérieure de toxines dont les standards sont devenus disponibles (PTX2 et dérivés, SPXs), laisse à penser que ces mêmes toxines pourraient être à l'origine de certains épisodes passés.

⁴ Collaboration Etat, Région, universités, Ifremer, Muséum National d'Histoire Naturel, CNRS, INRA, Afssa.

4- S'agissant de la concordance entre les différents tests relevée suite à cette analyse historique

Des études préliminaires de concordance transmises à l'Afssa par l'Ifremer, entre les résultats du test sur souris et ceux des analyses chimiques par CL-SM/SM, sur les mêmes échantillons ont été réalisées durant la période 2002-2004. Les données montrent que sur 255 échantillons analysés sur la période 2002-2004 tous coquillages confondus originaires de l'ensemble du littoral national, le pourcentage de concordance des résultats des 2 tests est de 74 %.

- entre bio-essai positif⁵ et analyse chimique montrant une teneur en toxines inférieure à 160 µg/kg de coquillage, la non concordance est de 18,4 %;
- entre bio-essai négatif et analyse chimique montrant une teneur en toxines supérieure à 160 µg/kg de coquillage, la non concordance est de 7,6 %.

Sur la période 2005 (hors Arcachon), une étude similaire montre que ces non concordances sont respectivement de 20% et 7,5 %.

Quant à Arcachon, en 2005, sur les 35 échantillons étudiés, 34 sont non concordants.

Ces non concordances, dont le niveau semble exacerbé sur le Bassin d'Arcachon, pourraient être dues :

- concernant le bio-essai sur souris, à l'expression d'une toxicité globale basée sur le mode d'action qui fait intervenir la toxicité relative des différentes toxines associée éventuellement à des interactions avec des substances présentes dans la matrice analysée (par exemple avec des acides gras)
- concernant l'analyse chimique, à une identification et une quantification de toxines individuelles connues, basées sur une réponse moléculaire.

Les éléments de correspondance des résultats entre ces 2 méthodes ne sont pas encore parfaitement connus.

→ Conclusions et recommandations relatives aux enseignements qui peuvent être tirés de l'analyse historique des événements de contamination liés aux phycotoxines marines à Arcachon et sur l'ensemble du littoral français

- 1- Les épisodes de contamination des coquillages par des toxines de micro-algues dans le Bassin d'Arcachon ne sont pas récents et remontent au début des années 90 ;
- 2- Les décisions de gestion en termes de fermeture / ouverture du Bassin d'Arcachon n'ont pas toujours été en cohérence avec les résultats des tests utilisés, des situations de non fermeture ayant pu être observées en dépit de bio-essais sur souris positifs.
- 3- Sur l'ensemble du littoral français, plus de la moitié des épisodes de toxicité atypique est restée inexpliquée. Néanmoins, avec l'acquisition des connaissances et la disponibilité d'étalons pour certaines toxines, l'autre partie a pu être reliée à la présence de toxines connues ;
- 4- Il apparaît que le Bassin Arcachon est le siège d'épisodes de toxicité atypique depuis 2005 en fréquence disproportionnée par rapport au reste du littoral français, faisant de cette zone un des cas particuliers du littoral français. Ce constat justifie les recommandations spécifiques ci-dessous dédiées au Bassin d'Arcachon ;
- 5- En l'état actuel des méthodes et standards disponibles, le niveau de non concordance des résultats en France entre bio-essai et analyse chimique (LC-MS/MS) est non

⁵ Il convient de souligner qu'un test souris positif correspond, au regard de ces pourcentages, à son interprétation réglementaire (au moins 2 souris mortes sur 3 dans le délai de 24h). Toutefois, un test souris négatif n'équivaut pas forcément à une absence totale de toxicité chez la souris dans la mesure où le niveau de toxines est compris entre « non détecté » et inférieur à 160 µg/kg de coquillages (voir question IV du rapport).

négligeable pour les toxines lipophiles. Elle est en partie liée au fait que le bio-essai exprime une activité toxique globale alors que l'analyse chimique identifie spécifiquement des toxines connues ;

- 6- Dans la mesure où ces méthodes et standards ne sont pas destinés à renseigner les mêmes paramètres, il conviendrait de proposer des stratégies d'usage de ces méthodes aux autorités sanitaires en cas de situation de toxicité atypique (cf question IV).

III- Procéder à une analyse critique du dispositif actuellement en place tout au long de la filière⁶ et jusqu'à la remise au consommateur, au regard des réglementations européenne et nationale

Un rappel des réglementations européenne et nationale encadrant le dispositif de surveillance des coquillages depuis les zones de production jusqu'à la remise au consommateur figure dans le rapport joint. L'élément clé est la mise en application, depuis le 1^{er} janvier 2006, des textes du « Paquet hygiène » (PH) dont certains ciblent spécifiquement les coquillages. D'application directe, cette réglementation est en cours de mise en oeuvre, notamment dans ce domaine particulier des coquillages.

L'expertise de cette question III s'est articulée de la façon suivante :

- Il a été procédé, dans un premier temps, à un examen critique des textes du « Paquet hygiène » dans le but de mettre en évidence (i) les améliorations d'ores et déjà apportées par ce nouveau cadre par rapport à la réglementation antérieure, et (ii) les points faibles ou flous de ces nouveaux textes européens ;
- Puis, une identification des points forts du dispositif national tel qu'il est en place à l'heure actuelle a été conduite ;
- Pour aboutir à une mise en évidence des points perfectibles du dispositif national au regard des enseignements tirés des différents événements de contamination survenus en France ces dernières années.

Il convient de noter que, pour ce qui concerne les règles d'hygiène relatives à la production et à la mise sur le marché des mollusques bivalves vivants, les dispositions des directives 91/492/CEE⁷ du 15 juillet 1995 et 97/61/CE⁸ du 20 octobre 1997 et de la décision 2002/225/CE⁹ du 15 mars 2002 ont été très largement reprises dans le « Paquet Hygiène » (PH).

1- S'agissant des améliorations apportées par le « Paquet hygiène » par rapport à la réglementation communautaire antérieure

D'une manière générale, le « Paquet Hygiène » clarifie le partage de responsabilités entre l'exploitant et les services de contrôle en matière de sécurité sanitaire ce qui se traduit notamment pour les exploitants, par le passage d'une obligation de moyens à une obligation de résultats. Il se fonde sur une utilisation plus systématique de l'analyse des risques tant pour le gestionnaire que pour la profession. Les exploitants doivent notamment mettre en oeuvre les bonnes pratiques d'hygiène complétées par des procédures fondées sur les principes de l'HACCP (analyse des risques et maîtrise des points critiques).

⁶ Cf. schéma général du dispositif actuellement en place (annexe 1)

⁷ La Directive 91/492/CEE fixe les règles sanitaires pour la production et la mise sur le marché des mollusques bivalves vivants (MBV) actuellement abrogée.

⁸ La Directive 97/61/CE modifie la Directive 91/492/CEE notamment en y introduisant le contrôle des phycotoxines amnésiantes (article premier, point 5)

⁹ La Décision 2002/225/CE fixe les modalités d'application de la directive 91/492/CEE en ce qui concerne les limites maximales et les méthodes d'analyse pour certaines toxines dans les MBV. Il s'agit des 4 familles de toxines lipophiles. C'est désormais le règlement 853/2004 qui fixe ces limites.

Le règlement (CE) n°178/2002 affirme l'obligation de traçabilité de la production primaire des denrées à leur mise sur le marché. Le règlement (CE) n°853/2004 introduit la possibilité d'évolution de la réglementation, en coopération avec le Laboratoire Communautaire de Référence concerné, pour répondre à de nouvelles connaissances concernant de nouvelles toxines, les virus (valeurs seuils et méthodes ainsi que l'échantillonnage) et tout autre risque pour la santé publique.

Pour ce qui concerne la surveillance phytoplanctonique, le règlement (CE) n°854/2004 apporte des précisions concernant l'échantillonnage en s'appuyant sur la notion de représentativité, aussi bien pour les points soumis à prélèvements que pour l'analyse du phytoplancton au sein de la colonne d'eau et enfin l'utilisation de coquillages sentinelles du niveau de contamination. Il est spécifié que l'échantillonnage doit être réévalué en fonction de l'évolution des risques. Ces précisions laissent néanmoins une flexibilité d'application qui devrait permettre de répondre aux spécificités nationales.

2- S'agissant néanmoins des points faibles ou flous de ces nouveaux textes européens

Si le « Paquet Hygiène » a pour principe une obligation de résultats et une globalisation des responsabilités, ce qui est positif, certains termes apparaissent néanmoins ambitieux et flous. Ainsi dans le règlement 852, il est noté : « (...) niveau élevé de protection de la vie et de la santé humaine (...) et (...) principal objectif d'assurer au consommateur un niveau de protection élevé en matière de sécurité alimentaire » avec pour moyens « une approche intégrée est nécessaire pour garantir la sûreté alimentaire du lieu de production primaire jusqu'à la mise sur le marché et l'exportation incluses. Chaque exploitant du secteur alimentaire tout au long de la chaîne devrait veiller à ce que la sûreté alimentaire ne soit pas compromise ».

Concernant les normes en phycotoxines (règlement (CE) n°853/2004), il est mentionné que la quantité en toxines doit être mesurée dans le « corps entier » ou « dans toute partie comestible », ce qui risque fortement de mener à une hétérogénéité d'application entre les états membres et les pays tiers, en particulier pour les coquilles St Jacques . En effet, celles-ci sont présentées sous des formes variées sur le marché et les fermetures des zones de pêche sont plus ou moins restrictives. En France, où la coquille St Jacques est largement vendue entière dans sa coquille et à l'état frais, les fermetures sont prononcées sur l'analyse sur corps entier en incluant l'hépatopancréas où sont concentrées les phycotoxines alors que certains pays n'analysent que la noix et/ou le corail. Il en résulte que pour un même niveau de contamination de zones, la fermeture sera plus ou moins restrictive selon les parties analysées.

Concernant les conditions de réouverture d'une zone fermée pour risque phycotoxinique, le règlement (CE) n°854/2004 stipule que la réouverture est conditionnée par deux analyses successives donnant des résultats favorables. Le règlement permet que le délai entre les 2 prélèvements successifs soit de 48 heures au minimum. Concernant ce délai, compte tenu des incertitudes sur la cinétique de décontamination, ainsi que sur l'hétérogénéité de la répartition des phycotoxines dans les coquillages et les eaux associées et compte tenu de l'arrêté du 21 mai 1999 (chapitre III article 18) qui fixait ce délai à 1 semaine avant l'application du « Paquet hygiène », les experts recommandent de maintenir une période d'une semaine entre 2 prélèvements successifs afin d'aboutir à une décontamination homogène et stable, en particulier dans le cas d'une toxicité atypique de nature inconnue.

Le règlement (CE) n°2073/2005 fixe deux critères microbiologiques de sécurité pour les mollusques bivalves mis sur le marché et pendant leur durée de conservation (*E. coli* et *Salmonella*). Il convient de s'interroger sur le fait que ces 2 critères sont suffisants, notamment au regard de *Vibrio*.

En conclusion, il apparaît que si des précisions ont été apportées à certains niveaux, il n'en demeure pas moins que de nombreuses questions scientifiques et techniques se posent quant à l'application du « Paquet Hygiène ». La flexibilité laissée permet une adaptation aux spécificités locales mais risque par ailleurs d'engendrer des hétérogénéités dans son application.

3- S'agissant des points forts du dispositif national actuel : un modèle historique et évolutif

Le dispositif national de surveillance des zones de production (Rephy) est l'un des premiers dispositifs européens mis en place pour prévenir le risque d'intoxication alimentaire par les phycotoxines. A ce titre, il a servi de référence pour l'élaboration de dispositifs dans d'autres pays. Il bénéficie d'une importante base de données historiques et scientifiques sur les évolutions et l'expansion des épisodes toxiques ayant affecté nos côtes.

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

Le dispositif national s'est encore renforcé en 1998 par la mise en place de plans de surveillance de la salubrité des coquillages au stade de la mise sur le marché mis en œuvre par la DGAI.

Le dispositif s'appuie sur 16 laboratoires répartis en 2 réseaux pour réaliser le contrôle de salubrité des coquillages :

- le réseau Rephy opéré par des laboratoires côtiers répartis sur le long du littoral français pour le contrôle des zones de production, liés au laboratoire expert phycotoxines de Ifremer-Nantes, sous la maîtrise d'ouvrage de la DPMA ;
- le réseau des Laboratoires départementaux d'analyse répartis sur le territoire pour le contrôle des coquillages sur le marché dans le cadre des plans de surveillance de la DGAI.

Ces 2 réseaux sont coordonnés par le Laboratoire National de Référence (LNR) des biotoxines marines de l'Afssa. Depuis ces dernières années, l'ensemble de ces laboratoires impliqués dans les analyses officielles participe aux Essais Inter-laboratoires d'Aptitude d'organisés annuellement par le LNR de manière à suivre la fiabilité des résultats produits. Le LNR est accrédité pour l'ensemble des méthodes officielles, comme près de la moitié des laboratoires des réseaux. Les autres laboratoires sont en processus d'accréditation. Par ailleurs, le LNR participe aux travaux coordonnés par le laboratoire communautaire de référence. Il est important de noter aussi que les scientifiques du LNR de l'Afssa et de l'Ifremer participent à plusieurs programmes de recherche engagés au niveau européen et international sur les efflorescences de micro-algues toxiques et la salubrité des produits de la mer.

Depuis ces dernières années, l'interaction entre les partenaires impliqués (DPMA, DGAL, LNR et Ifremer) s'est renforcée à travers la constitution d'un groupe de travail qui se réunit en tant que de besoin et au minimum une fois par an. Cela permet d'améliorer la réactivité pour adapter le dispositif aux évolutions, que ce soient en réponse à des recommandations faites par l'OAV ou pour répondre à l'expansion des épisodes toxiques et l'apparition de nouvelles toxines.

4- S'agissant des points perfectibles du dispositif national au regard des enseignements tirés des différents évènements de contamination survenus en France ces dernières années.

Pour rappel, l'expertise conduite n'a concerné que la problématique des phycotoxines marines : un avis complémentaire de l'Afssa sera rendu dans un second temps sur la surveillance microbiologique¹⁰ et la surveillance des contaminants physico-chimiques.

Quatre rubriques ont tout particulièrement été analysées par l'Afssa :

- La surveillance phycotoxinique ;

¹⁰ Toutefois, en raison de l'épisode récent de contamination par *Vibrio parahaemolyticus* des huîtres du Bassin d'Arcachon, une réflexion ciblée sur ce microorganisme a été conduite par l'Afssa suite à deux saisines inter-ministérielles et a fait l'objet de 3 notes rendues les 5 et 10 octobre 2006.

- Les conditions de mise sur le marché des coquillages ;
- Les dispositifs palliatifs ;
- Les modalités relatives aux traitements et au transport des prélèvements tout au long de la chaîne.

S'agissant de la surveillance phycotoxinique (hors réflexion sur les tests qui est traitée dans la question IV)

Quatre points critiques sont susceptibles de faire l'objet de recommandations.

- **Validité du phytoplancton comme indicateur**

La stratégie sanitaire du RePHY est différente selon que les coquillages sont proches de la côte ou au large.

Pour les gisements et les élevages côtiers :

- La stratégie retenue pour le risque associé aux phycotoxines paralysantes et aux phycotoxines amnésiantes est basée sur la détection dans l'eau des espèces présumées productrices de toxines, qui déclenche en cas de dépassement du seuil d'alerte phytoplancton, la recherche des phycotoxines correspondantes dans les coquillages ;
- Le risque lié aux toxines lipophiles est géré par une surveillance systématique des coquillages dans les zones à risque et en période à risque (voir définition en début de l'avis). En dehors des périodes à risque, la stratégie est identique à celle appliquée pour les phycotoxines paralysantes et aux phycotoxines amnésiantes.

L'analyse de la situation actuelle a permis de mettre en évidence :

- que l'indicateur phytoplancton pour le déclenchement des analyses de toxines amnésiantes et paralysantes dans les zones côtières est valide, à l'exception d'Arcachon pour les toxines paralysantes ;
- que l'indicateur phytoplancton n'est pas utilisé au large du fait de la non représentativité de l'échantillonnage dans la masse d'eau. En conséquence la surveillance systématique des gisements de coquillages au large est assurée pour les 3 familles de toxines en période de pêche¹¹ ;
- que le système actuel (depuis 2002) ne permet pas de déclencher la recherche d'une contamination par les toxines paralysantes ou amnésiantes sans observation préalable d'une espèce phytoplanctonique productrice connue ;
- qu'une surveillance systématique des toxines lipophiles dans les zones à risque en période à risque a été mise en place début 2005, suite aux recommandations de l'OAV (de 2001 et 2004) et en raison des incertitudes sur la détection de *Dinophysis* à très faible concentration, particulièrement en début d'épisode, de la difficulté de reconnaissance de certaines espèces productrices de toxines diarrhéiques (YTX, AZAs), et de la méconnaissance des seuils d'alerte pour ces dernières.

- **Pertinence des modalités d'échantillonnage sur les zones de production**

Il convient de souligner que les définitions de ces zones et périodes à risque rappelées ci-dessus ne concernent pas l'intégralité des toxines de micro-algues et varient selon les toxines : les azaspiracides et les yessotoxines ne sont pas prises en compte dans ces définitions du fait de leur non détection sur le littoral français.

¹¹ Ceci n'obère pas l'observation qui peut être réalisée au large de phytoplancton dans un souci d'anticipation des problèmes côtiers.

Pour tenir compte de ces spécificités et de ces incertitudes, le Rephy est en évolution permanente pour s'adapter à la recrudescence des événements phycotoxiques. Depuis 2002, le Rephy a intensifié son effort d'échantillonnage, que ce soit en points « eau » (identification des espèces toxiques, nuisibles ou douteuses) ou en points « coquillage » (analyses de niveaux de contamination).

Toutefois, la réglementation « Paquet hygiène » indique que l'échantillonnage optimum doit être hebdomadaire en règle générale, avec un ajustement de cette périodicité selon une évaluation de risque relative à la présence de toxines ou de phytoplancton potentiellement toxique.

Pendant les périodes hors périodes à risque, qui peuvent être des périodes de forte consommation¹², la fréquence de prélèvement d'eau pour comptage phytoplanctonique est de 14 jours. L'utilisation du phytoplancton indicateur des toxines paralysantes (hors Arcachon) et amnésiantes reste valide. En revanche, le phytoplancton indicateur de toxines lipophiles n'étant pas valide, l'absence de risque n'est pas garantie pour ce type de toxines. Dans la mesure où il est nécessaire de s'appuyer sur des résultats d'analyses directement sur le coquillage selon une fréquence et des zones à déterminer, il paraît pertinent de recommander un renforcement, tout au long de l'année, de la double surveillance « phytoplancton-toxines lipophiles » systématique menée par l'Ifremer, surveillance qui est actuellement sur 6 points à fréquence mensuelle.

Dans un premier temps, une étude spatio-temporelle du phytoplancton sur un site pilote régulièrement affecté par des contaminations par *Dinophysis* et ses toxines (AO et DTXs) pourrait être proposée. L'objectif quantifié à atteindre pour cette étude serait une estimation plus précise de la probabilité de conclure à tort à partir d'indicateurs phytoplanctoniques à une non contamination quand elle existe en réalité (appelé « risque consommateur »). Les modalités précises d'une telle étude restent à définir. Ce type de démarche devrait être de nature à permettre de vérifier si la couverture spatiale de la production française conchylicole est satisfaisante en s'appuyant sur les points Rephy actuellement définis.

- **Conditions de traitement des prélèvements**

Les experts proposent que la faisabilité de « pooler » plusieurs prélèvements de coquillages provenant d'un même site pour une même analyse dans le cadre de la rationalisation des contrôles fasse l'objet d'un examen spécifique par un groupe d'experts.

- **Surveillance des gisements au large**

D'après les informations transmises à l'Afssa, il apparaît que la liste des gisements exploités et les périodes d'ouverture de la pêche ne sont pas toujours transmises à l'Ifremer, ce qui peut contribuer à entraver la mise en place de la surveillance en temps utile.

En conséquence, il est nécessaire que la transmission de l'information soit améliorée.

- **Pertinence de mettre en place un comité de pilotage « Biotoxines Marines »**

Il existe actuellement un Comité Scientifique et Technique de la Surveillance (CSTS), interne à l'Ifremer. Des représentants du MEDD¹³, de la DPMA, de l'Afssa et des Agences de l'eau sont invités à participer à ses réunions. Il s'agit d'une instance consultative susceptible d'être saisie par les administrations de tutelle.

Son mandat doit être mis à profit utilement pour contribuer à la réflexion relative à la définition des zones et des périodes à risque et aux des modalités d'échantillonnage des zones de production.

¹² Entre 40 et 60% de la commercialisation des huîtres a lieu en période hivernale selon les zones.

¹³ Ministère de l'Environnement et du développement durable

→ **Conclusions et recommandations relatives à la surveillance phycotoxique**

- 1- La validité du phytoplancton comme indicateur de risque de contamination des coquillages dans les zones côtières est affirmée pour les phycotoxines paralysantes et amnésiantes, mais pas de façon générale pour les toxines lipophiles. Il pourrait être recommandé :
 - que les données phytoplanctoniques du Bassin d'Arcachon fassent l'objet d'une étude historique liée à la présence de toxines paralysantes dans les coquillages du bassin d'Arcachon sans détection de phytoplancton connu ;
 - de tirer des enseignements de l'expérience des autres pays sur des problèmes similaires ;
 - de définir les modalités du renforcement, tout au long de l'année, de la double surveillance systématique « phytoplancton-toxines lipophiles » qui est actuellement menée par l'Ifremer sur 6 points à fréquence mensuelle (fréquence et choix des zones à déterminer).
- 2- Concernant le délai minimum entre 2 prélèvements successifs en vue d'une réouverture, les experts recommandent de maintenir le délai d'1 semaine, afin d'aboutir à une décontamination homogène et stable, en particulier dans le cas d'une toxicité atypique de nature inconnue.
- 3- Il est recommandé la mise en place d'une étude pilote menée pour évaluer l'hétérogénéité de la contamination des coquillages dans une zone connue afin de pouvoir estimer plus précisément la probabilité de conclure à tort à une non contamination quand elle existe en réalité. Les modalités précises d'une telle étude restent à définir.
- 4- Le mandat du Comité Scientifique et Technique de la Surveillance de l'Ifremer doit être mis à profit utilement pour contribuer à la réflexion relative à la définition des zones et des périodes à risque et aux des modalités d'échantillonnage des zones de production.

2- Les conditions de mise sur le marché des coquillages

En matière de coquillage, les activités de vente au consommateur (remise directe) sont couvertes par le Paquet hygiène. L'exploitant qui met sur le marché des coquillages doit respecter les règles générales d'hygiène énoncées dans les règlements (CE) n°852/2004 et 853/2004.

Néanmoins l'analyse approfondie de cette phase du dispositif conduit à faire les observations et recommandations suivantes :

S'agissant des conditions de mise en place des plans de surveillance des phycotoxines dans les mollusques bivalves

Les plans de surveillance mis en place chaque année ont pour objectif d'évaluer la conformité des coquillages mis sur le marché en France. L'élaboration de ces plans annuels, placés sous la responsabilité de la DGAI, se fait en concertation avec le LNR de l'Afssa pour ce qui concerne les modalités de prélèvement, les méthodes d'analyse, la liste des laboratoires compétents. Mais le LNR n'est pas consulté jusqu'à présent sur les modalités d'échantillonnage.

Environ 500 échantillons par an sont prélevés sur un mode exclusivement aléatoire comme l'exige le règlement (CE) n°854/2004. Il conviendrait toutefois de savoir concrètement comment ce caractère aléatoire est atteint. L'appui de l'Afssa serait à cet égard utile. D'après les informations transmises à l'Agence pour le plan 2005, le taux de réalisation pour les coquillages

de conchyliculture se situe entre 93 et 95 % selon les biotoxines recherchées¹⁴, et le taux de conformité annoncé par les autorités sanitaires atteint 99%.

S'agissant de l'exploitation en temps réel de ces plans.

En cas de résultat positif sur un échantillon, la procédure actuelle nécessite d'attendre la confirmation du LNR avant de prendre des mesures de gestion, ce qui peut exiger un délai de l'ordre de 2 à 3 semaines. Ce délai est incompatible avec celui de la consommation des coquillages qui est, généralement, très court et avec celui requis par la mise en œuvre des mesures de gestion de la zone de production (néanmoins, l'enquête de traçabilité est, elle, mise en œuvre sans délai). Il conviendrait, dans la mesure du possible, de le réduire.

C'est la raison pour laquelle, il est proposé que la vérification des non conformités, dans le cadre des plans de surveillance de la DGAI, ne soit plus assurée systématiquement par le LNR. Cela serait remplacé par la réalisation par le LNR de confirmations positives et négatives en complément de l'organisation annuelle des essais inter-laboratoires d'aptitude pour l'ensemble des laboratoires impliqués dans le contrôle officiel. Cette démarche du LNR ne devrait pas se substituer à la nécessité que chaque laboratoire a de garantir la fiabilité de ses résultats au travers de son système d'assurance qualité.

La conséquence de cette proposition serait que les mesures de gestion, reliées aux plans de surveillance, se fonderaient sur les résultats acquis en première intention de la même façon que pour les zones de production.

Dans la mesure où tous les laboratoires ne sont pas encore accrédités, il est nécessaire que soient définies des procédures d'agrément temporaire de ces laboratoires prévues dans le décret « Laboratoires » n° 2006-7.

S'agissant des conditions de sécurisation de la remise des produits aux consommateurs

- **Le classement du Bassin d'Arcachon**

Le Bassin d'Arcachon est classé en zone A pour ce qui concerne les zones de production. Toutefois, l'eau utilisée par les établissements conchylicoles est pompée en zone B qui cerne le pourtour du Bassin. Cette eau subit des traitements *ad hoc* et bénéficie d'auto-contrôles de la profession. Toutefois, la visibilité des administrations sur la qualité de cette eau n'est pas complète. Cet aspect sera en tout état de cause examiné sur le fond dans l'avis complémentaire que l'Afssa rendra sur la question des contaminants biologiques.

- **Les intermédiaires**

Il apparaît que certains opérateurs se livrent à des opérations de re-conditionnement susceptibles d'entraîner une perte de traçabilité. Il conviendrait donc que les autorités de gestion prennent les dispositions adaptées pour encadrer ces pratiques, notamment en exigeant que figure, sur l'étiquetage des produits re-conditionnés, le lieu d'élevage des coquillages.

- **Les distributeurs**

Une attention toute particulière a été portée par l'Agence sur les activités de dégustation de ces produits. Il a été indiqué à l'Agence que la remise aux consommateurs des coquillages dans ce contexte particulier est couverte par les contrôles effectués aux niveaux des établissements et sur les marchés.

S'agissant de la maîtrise de la décision de retrait en cas de contamination

En cas de fermeture d'une zone de production, le retrait de la commercialisation des coquillages est à mettre en place sous la responsabilité du professionnel (règlement (CE) n°178/2002). Si ce

¹⁴ Une amélioration de ce taux a été notée par rapport aux années passées : il était de 50% en 2004 du fait de difficultés budgétaires. Par ailleurs, il a été indiqué à l'Agence que la baisse du nombre d'analyse effectuées par la DDSV de Gironde dans les établissements conchylicoles est imputable à une alerte rage cette année dans le département.

retrait n'est pas efficace, la DDSV ou la DGAI peut prendre des mesures afin d'améliorer l'effectivité du retrait.

Toutefois, 2 difficultés sont identifiées :

- Les mentions réglementaires sur un colis ne permettent pas de repérer facilement les lots concernés. En complément de la date du conditionnement, la mention « Elevé en France » et du numéro d'agrément du centre expéditeur commençant par le numéro du département, il conviendrait de mentionner la date de récolte et l'origine exacte des produits, ce qui tendrait à améliorer les conditions du retrait ;
- La communication des résultats de surveillance de zones, comme des décisions du Préfet à l'ensemble des professionnels mériterait d'être améliorée. Depuis 2006, la DGAI émet systématiquement un message d'alerte à l'intention des professionnels d'aval (les DDSV étant destinataires simultanément de ce message). Par ailleurs, certains préfets diffusent une date butoir (correspondant au minimum à la date du prélèvement ayant entraîné la fermeture de la zone) à partir de laquelle les coquillages récoltés ne doivent pas être consommés : cette nouvelle procédure devrait être généralisée ;

Remarque : Tous les coquillages sortis de la zone devraient être concernés par le retrait, y compris ceux entrant dans certaines pratiques non autorisées consistant en des transferts de coquillages d'élevage¹⁵.

S'agissant des auto-contrôles effectués par les professionnels

Réglementairement, le nouveau décret « Laboratoires » N°2006-7 prévoit que ces auto-contrôles soient réalisés avec des méthodes reconnues et par des laboratoires reconnus par le Ministère de l'Agriculture et de la Pêche. Pour le « Paquet hygiène », les méthodes doivent correspondre aux méthodes de référence ou à toute autre méthode reconnue (règlements (CE) n°2073/2005 et 2074/2005).

Il conviendrait donc de déterminer les méthodes d'analyse et d'identifier les laboratoires compétents. Pour le contrôle de l'ensemble des familles des toxines lipophiles, le bio-essai sur souris est le seul actuellement disponible, dans l'attente de méthodes alternatives validées.

S'agissant du guide de bonnes pratiques d'hygiène (GBPH)

Le GBPH est en cours de finalisation après un premier avis défavorable rendu par l'Afssa en 2003. Cette seconde version devrait être soumise à l'Agence avant la fin de l'année 2006. La parution et la mise en application de ce GBPH sont considérées comme une priorité.¹⁶

S'agissant de la sécurité des zones de pêche de loisir

D'après les informations transmises à l'Agence, la transmission de l'information entre la fermeture de zones de production et la gestion des zones de pêche de loisir à proximité mériterait d'être améliorée. Actuellement, les DDASS et DDRASS, qui ont la charge de surveiller ces zones, ne sont informées qu'au travers du bulletin Ifremer. Il a été indiqué que la qualité de cette surveillance est très inégale selon les départements. Il conviendrait donc que les autorités sanitaires fassent un recensement des modalités de surveillance de ces zones.

S'agissant des conditions de transport des prélèvements

Suite aux épisodes récents de contamination (par phycotoxines et par *Vibrio*) du Bassin d'Arcachon, il convient de veiller à ce que les conditions de transport des prélèvements soient optimales, et ce à deux niveaux :

¹⁵ Cet usage présente un double risque dans la mesure où (i) les coquillages ré-immersés n'ont pas forcément le temps de se décontaminer avant d'être commercialisés et où (ii) la zone de production d'accueil peut devenir contaminée par de tels coquillages

¹⁶ Il convient de souligner que la Profession n'était pas dans l'obligation du respect de l'HACCP jusqu'à la mise en place du « Paquet hygiène ».

- Les temps de transit des échantillons entre les différents laboratoires concernés ;
- Les conditions de transport des échantillons qui doivent garantir une étanchéité parfaite et le maintien d'une température optimale.

→ **Conclusions et recommandations relatives aux conditions de remise des produits aux consommateurs**

- 1- L'appui de l'Afssa devrait désormais être systématique pour l'élaboration de l'échantillonnage des plans de surveillance de la DGAI ;
- 2- Il conviendrait que les autorités sanitaires s'assurent de la traçabilité continue des produits remis aux consommateurs dans la mesure où certaines pratiques de re-conditionnement sont susceptibles de fragiliser la sécurisation de la chaîne, notamment en exigeant que figure, sur l'étiquetage des produits re-conditionnés, le lieu d'élevage des coquillages ;
- 3- Pour optimiser les conditions de retrait des lots, une modification des mentions figurant sur les colis serait hautement souhaitable et l'information de tous les partenaires concernés devrait être améliorée (ce qui est déjà amorcé depuis 2006)
- 4- Il conviendrait de renforcer les contrôles sur les opérations de transfert des coquillages d'élevage lors des mesures de restriction de commercialisation ;
- 5- Pour promouvoir la réalisation d'auto-contrôles, il serait souhaitable que les autorités compétentes définissent les méthodes d'analyse et identifient les laboratoires compétents pour les réaliser ;
- 6- La finalisation du GBPH de la profession est une priorité ;
- 7- La sécurité des zones de pêche de loisir ne paraît pas assurée. Il conviendrait que (i) la transmission de l'information entre la fermeture de zones de production et la gestion des zones de pêche de loisir à proximité soit améliorée, (ii) que les autorités sanitaires procèdent à un recensement des modalités de surveillance de l'ensemble des zones de pêche de loisir et (iii) qu'elles mettent en place des messages d'alerte vers la population en situation de risque ;
- 8- Il convient de veiller à ce que les conditions de transport des prélèvements destinés aux tests vers les laboratoires concernés soient optimales.

3- Les dispositifs palliatifs

Ces dispositifs comprennent :

- Les dispositifs de stockage protégé des coquillages qu'il s'agisse des malines ou des bassins en circuit fermé des établissements conchylicoles ;
- Les dispositifs de détoxification en bassin des coquillages contaminés ;
- Les zones refuge.

S'agissant des dispositifs de stockage protégés (malines et bassins dégorgeoirs ou de purification)

La description précise de ces dispositifs figure dans le rapport joint.

Lors de l'épisode de contamination ayant entraîné la fermeture du bassin d'Arcachon en mai dernier, la Section Régionale Conchylicole et le Préfet de la Gironde ont entériné un protocole de fonctionnement des établissements permettant la mise sur le marché des coquillages vivants en période de contamination des coquillages du bassin d'Arcachon par des phycotoxines.

Ce protocole est mis en œuvre à condition que les exploitants apportent les garanties nécessaires permettant de mettre sur le marché des coquillages propres à la consommation humaine (approvisionnement sécurisé en coquillages et en eau) et nécessite la mise en place de contrôles renforcés de la part des services compétents.

L'analyse détaillée de ces dispositifs met en évidence un certain nombre d'interrogations sur la maîtrise de leur fonctionnement.

- **Les modalités d'approvisionnement en eau de ces bassins de stockage**

Pour le fonctionnement des établissements, le protocole prévoit actuellement pour l'approvisionnement en eau des établissements :

- soit une eau du Bassin d'Arcachon si elle a été pompée au plus tard la veille du jour du prélèvement ayant permis de constater la contamination des coquillages dans la zone ;
- soit une eau d'une autre origine (forage, apport d'une eau d'un autre bassin ouvert par camion citerne, eau de mer reconstituée).

Si les définitions réglementaires de l'eau de mer « propre » restent vagues (règlement (CE) n°852/2004), la France a précisé les indicateurs bactériologiques de conformité d'une eau de mer pompée : moins de 15 *E. coli* dans 100 ml d'eau et absence de salmonelles dans 5 litres d'eau¹⁷. Mais aucun critère n'a été fixé, à ce jour, pour les métaux lourds et les algues toxiques. L'eau utilisée pour ces bassins de stockage ne doit pas être contaminée par des microorganismes ou des algues toxiques dont les conditions de développement pourraient se trouver facilitées par l'augmentation de la température de l'eau des bassins. Un avis récent de l'Ifremer¹⁸ indique que « l'absence de contamination des coquillages retrempés dès lors que l'eau du bassin est susceptible de contenir des algues toxiques ne peut être garantie » et ce quelle que soit la durée du retrempeage. L'eau pompée dans une zone fermée pour contamination phycotoxique ne peut donc être utilisée dans les établissements conchylicoles.

Par conséquent, dans le but de renforcer le niveau de sécurisation du protocole, l'origine de l'eau devrait être issue exclusivement de zones non contaminées, de forages ou d'eau de mer reconstituée. Elle ne devrait pas provenir du Bassin d'Arcachon quelle que soit la situation. En effet, l'Afssa n'est pas en mesure d'identifier de critères suffisamment fiables permettant de sécuriser l'approvisionnement en eau des bassins de stockage à partir du Bassin d'Arcachon, même si ce pompage est intervenu alors que la zone était ouverte. En effet, au sein du Bassin d'Arcachon, les points de pompage de l'eau de mer ne sont généralement pas situés à proximité des points Rephy¹⁹.

Il s'avère néanmoins intéressant d'explorer la possibilité d'utiliser des dispositifs de filtration pour permettre un pompage à partir du Bassin d'Arcachon.

- **S'agissant des auto-contrôles prescrits dans le cadre du protocole**

Les auto-contrôles prescrits dans le protocole s'avèrent insuffisants :

- pour le dénombrement en micro-algues il n'existe pas de méthodologie permettant de garantir l'absence de cellules toxiques ;
- pour les tests sur coquillages, il convient de recourir au bio-essai sur souris dans l'attente de la validation de méthodes alternatives.

- **D'une façon plus générale à propos du protocole**

Dans la mesure où la démarche de stockage correspond à un dispositif palliatif, la traçabilité constitue un paramètre essentiel de sa mise en œuvre sur lequel il convient d'insister tout

¹⁷ Note de service du 27 mars 2003.

¹⁸ 20 juillet 2006

¹⁹ Les experts ont néanmoins tenté d'examiner la possibilité que certains établissements qui fonctionnent en circuit fermé avec une eau pompée depuis au moins 10 jours (délai fondé sur la périodicité hebdomadaire des prélèvements) dans le Bassin d'Arcachon puissent continuer à fonctionner. L'eau devrait avoir été pompée préalablement à la date du prélèvement ayant donné lieu au dernier résultat négatif sur le coquillage. Ce scénario paraît difficilement envisageable en raison de la difficulté de tracer la date de pompage. De plus, il est nécessaire de disposer du résultat d'un bio-essai négatif antérieur.

particulièrement. En outre, il est recommandé de renforcer la pression d'inspection lors de la mise en place du protocole.

S'agissant des dispositifs de détoxification en bassin des coquillages contaminés

Aucune étude à ce jour ne démontre de façon probante que de tels dispositifs sont de nature à réduire, voire annuler, la charge en contaminants phycotoxiques des coquillages.

S'agissant des zones refuge

Ce système consiste à déplacer les coquillages d'une zone de production qui risque de se contaminer vers une autre zone de production à l'abri de toute contamination pour l'épisode en cours. Au vu des conclusions présentées ci-dessus sur la sectorisation, de telles zones refuge ne pourraient être mises en place dans le Bassin d'Arcachon en l'état actuel des connaissances.

→ Conclusions et recommandations relatives aux dispositifs palliatifs

Dans le cadre de la révision du protocole qui doit avoir lieu, il conviendrait :

- 1- de fixer des critères précis permettant de caractériser une eau de mer « propre » en fonction de l'utilisation qui en est faite. Une attention toute particulière sera portée sur les points de pompage de l'eau de mer sachant qu'ils ne sont pas situés systématiquement à proximité des points RePHY. Il convient également de mettre en place les méthodes d'analyse pour évaluer ces critères ;
- 2- d'utiliser dans les établissements conchylicoles fonctionnant sous protocole une eau pompée dans une zone ouverte située hors du Bassin d'Arcachon ou provenant de forages ou d'eau de mer reconstituée ;
- 3- de disposer d'un éclairage sur l'efficacité des traitements de filtration destinés à éliminer le phytoplancton de l'eau de mer et sur les systèmes permettant d'éliminer d'éventuelles toxines libres. A cet égard, un rapprochement avec les entreprises de traitement de l'eau pourrait être utile ;
- 4- de recommander une pression d'inspection renforcée lors de la mise en place du protocole.

IV- Conduire une réflexion permettant de préciser les apports et les limites de l'utilisation du « bio-essai souris » dans l'objectif de protection de la santé du consommateur que ce soit dans un cadre de surveillance ou de vigilance

Les éléments développés par le GECU afin de répondre à cette question présentés au Comité d'experts spécialisé « Résidus et Contaminants Chimiques et Physiques » en séance plénière du 18 octobre 2006 l'ont conduit à émettre des propositions figurant en annexe 2 du présent avis.

Les caractéristiques des différents tests de dépistage et d'identification des phycotoxines sont développées dans le rapport scientifique joint.

En préambule, deux distinctions sont à faire :

- D'une part, distinguer les toxines lipophiles des toxines hydrophiles. En effet, l'analyse des experts, au regard de la problématique du test, a porté exclusivement sur les toxines lipophiles car ce sont exclusivement elles qui ont soulevé des questions lors des derniers épisodes de contamination;
- D'autre part, distinguer le cadre de la surveillance de celui de la vigilance. Le premier concerne le contrôle des niveaux de contamination des coquillages par les phycotoxines connues, alors que le second a pour objectif de repérer l'émergence de nouvelles substances potentiellement toxiques pour l'homme.

Les principales questions soulevées par la problématique des tests sont les suivantes :

1- Quels seraient les pré-requis d'un test idéal susceptible de garantir le meilleur niveau de protection du consommateur vis à vis des toxines lipophiles ?

D'après les experts et dans un objectif sanitaire, le test idéal serait un test qui permettrait de détecter l'ensemble des toxines lipophiles susceptibles d'être responsables d'intoxication chez le consommateur et de déterminer leur niveau de présence dans les coquillages. Ce test idéal devrait, de plus, bénéficier d'une validation internationale de manière à caractériser ses performances et sa variabilité.

Le choix d'un tel test ne peut pas être fondé uniquement sur les performances intrinsèques de la méthode donnée mais doit également prendre en compte la réalité opérationnelle dans le cadre de son déploiement dans un dispositif de surveillance. Il existe actuellement plusieurs méthodes de détection et/ou de quantification basées sur des principes différents et dont les résultats indiquent des informations de différente nature. Ainsi, ces diverses méthodes ne seraient pas en compétition mais plutôt complémentaires.

On distingue schématiquement les bio-essais sur souris, les tests basés sur le mode d'action encore appelés tests fonctionnels, les tests immunochimiques, les tests d'immunochromatographie en flux latéral, la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (le plus souvent en tandem, à savoir LC-MS/MS).

En l'état actuel de la réglementation communautaire, seul le bio-essai sur souris est reconnu comme le test de référence pour les toxines lipophiles en raison notamment de l'efficacité qu'il a pu montrer à travers sa pratique depuis de nombreuses années dans de nombreux pays. Néanmoins, le bio-essai n'est pas validé²⁰ selon les critères normalisés. Mais plutôt par une longue expérience qui a permis l'amélioration des conditions de sa mise en œuvre et l'acquisition de données issues d'analyses inter-laboratoires d'aptitude réalisés au niveau national et communautaire. Il n'existe pas de méthode alternative officiellement reconnue à ce jour.

2- S'agissant de la comparaison des différents tests par rapport aux critères du test idéal pour la détection des toxines lipophiles

Le bio-essai sur souris par voie intrapéritonéale (IP) est le test :

- qui présente les meilleures performances pour la mise en évidence d'une toxicité globale au regard de l'ensemble des familles de toxines lipophiles ;
- qui est le seul à permettre en routine la détection d'une toxicité nouvelle ou émergente ou de nouveaux analogues d'une toxine déjà connue ;
- qui pose des problèmes de spécificité en raison de risque d'interférences ;
- dont la fiabilité est liée à la variabilité du matériel biologique (la souris) ;
- dont la mise en œuvre est la plus longue ;
- qui permet de fournir une réponse qualitative au seuil de salubrité doublée d'indications symptomatologiques ;
- dont les exigences logistiques sont loin d'être négligeables (transfert en réseaux, qualification du personnel, approvisionnement en souris, coût) ;
- qui ne permet pas de déterminer un niveau d'exposition sub-clinique ;
- qui pose la question de l'extrapolation de la voie intrapéritonéale à la voie orale et des enseignements que l'on peut en tirer en termes de risque chez l'homme.

²⁰ En 1999, sur proposition du Laboratoire Communautaire de Référence (LCR) de valider et normaliser le bio-essai sur souris, le Comité Européen de Normalisation a opposé un refus pour ne pas entrer en contradiction avec la réglementation européenne qui vise au remplacement des tests sur animaux.

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse est le test :

- qui est le plus spécifique et qui peut constituer la méthode de référence par excellence pour les toxines connues ;
- dont la mise en œuvre est la plus rapide ;
- qui présente de bonnes performances pour la mise en évidence d'un spectre global de toxines connues ;
- qui ne permet pas en routine, à ce jour, l'identification d'une nouvelle toxine non identifiée ou de nouveaux analogues d'une toxine déjà connue mais qui en aurait les capacités ;
- dont la fiabilité est maximale ;
- qui permet de fournir une réponse qualitative et quantitative avec une sensibilité très inférieure au seuil de salubrité et avec une variabilité inférieure à celle du bio-essai (< à 10%) ;
- qui permet de déterminer un niveau d'exposition sub-clinique ;
- dont les exigences logistiques ne sont pas favorables pour la possibilité de transfert en réseaux et dont le coût et le niveau de qualification du personnel sont très élevés.

Les autres tests :

- ont une spécificité assez limitée ;
- sont rapides ;
- ne renseignent que moyennement sur une toxicité globale (sauf les tests fonctionnels plus performants sur ce point) ;
- ne permettent pas de mettre en évidence une nouvelle toxine non identifiée ni de nouveaux analogues d'une toxine déjà connue (sauf les tests fonctionnels qui permettent l'identification de ces nouveaux analogues) ;
- dont la fiabilité est mal connue en termes de risque de faux positifs et faux négatifs ;
- qui permettent de fournir une réponse semi-quantitative et quantitatives (selon les kits) mais avec un manque de données permettant de fiabiliser les résultats ;
- dont les exigences logistiques sont globalement très favorables.
- Ces tests pourraient servir à des auto-contrôles une fois validés au niveau communautaire.

Le bio-essai sur rongeur par voie orale

Ce test n'est actuellement pas mis au point sur souris et est du domaine de la recherche. Un test similaire a été mis au point durant les années 1980 chez le rat. Il est basé non pas sur la mort des animaux mais sur l'observation de symptômes diarrhéiques (score gradué selon l'état des fèces). Mais il convient de noter que son utilisation est restée très marginale.

Néanmoins il est logique de s'interroger sur la pertinence de l'administration par la voie orale compte tenu du danger que l'on cherche à caractériser. En effet, les toxines ingérées sont susceptibles de subir des phénomènes de bio-activation et de bio-dégradation au niveau digestif qu'il conviendrait de prendre en compte dans un scénario de réalisme biologique.

3- S'agissant des questions soulevées par le bio-essai sur souris**Signification des termes « faux négatifs » et « faux positifs »**

En préambule, il convient de souligner que le bio-essai sur souris est seulement un test de salubrité. Son résultat est binaire vis à vis du seuil réglementaire. Dans ce cas, il est très important de souligner que la notion de « faux positifs » et « faux négatifs » est une notion relative aux conditions expérimentales et au référentiel de comparaison. Les experts considèrent que ces termes sont ambigus et ne recouvrent pas les différentes réalités biologiques sous-jacentes. Il s'agit de non concordances comme évoqué précédemment. C'est ainsi que :

- Pour le terme « faux positifs » il s'agit plutôt « d'échantillon non conforme dont le danger n'a pas été identifié » correspondant à une situation où l'échantillon a donné un résultat positif dans le bio-essai sur souris et pour lequel par analyse chimique, la teneur en toxines réglementées est inférieure au seuil réglementaire. La présence d'autres facteurs toxiques peut avoir entraîné la positivité du test. Ceci peut correspondre soit à un danger

non identifié, soit à un danger non quantifié. Deux origines sont possibles : soit une toxicité atypique que l'on ne connaît pas, soit des interférences.

- Pour le terme « faux négatif » il s'agit plutôt « d'échantillon conforme par bio-essai (0 ou 1 souris morte avec symptômes toxiques) pour lequel l'analyse chimique révèle une teneur totale (somme des quantités de toxines connues) supérieure au seuil de salubrité ». Ceci peut s'expliquer par la méconnaissance des facteurs de toxicité relative des différentes toxines par rapport à la toxine de référence (AO).

La question des témoins pour le bio-essai sur souris

Idéalement, toute série d'analyses doit être encadrée par un témoin négatif et un témoin positif (matériau de référence fabriqué à partir des coquillages). Ce point n'est pas renseigné dans la méthode de référence recommandée par le Laboratoire Communautaire de Référence (LCR). Actuellement le Laboratoire National de Référence (LNR) procède pour chaque série d'analyses à la mise en œuvre alternativement d'un témoin positif et d'un témoin négatif²¹, pour des raisons d'organisation pratique et pour des raisons éthiques en vue de limiter le nombre d'animaux utilisés. Bien que n'étant pas dans une situation optimale, cette procédure permet de détecter d'éventuelles défaillances dans chaque série d'analyses.

Il est cependant nécessaire que ces contrôles soient renforcés et harmonisés par tous les laboratoires impliqués dans le contrôle officiel. C'est la raison pour laquelle le LNR de l'Afssa produira des procédures officielles d'application en conformité avec les exigences du COFRAC et en prenant en compte les fortes contraintes opérationnelles liées à un tel test.

Le LNR recommandera donc un protocole relatif à la gestion des témoins à l'ensemble des laboratoires concernés.

Les améliorations qui pourraient être envisagées concernant le bio-essai

Les experts se sont interrogés sur la possibilité de réduire la variabilité du résultat du bio-essai sur souris, comme par exemple :

- Augmentation du nombre actuel de souris utilisé ;
- Considération de la positivité du bio-essai souris dès la mort d'une souris ;
- Mise au point d'un bio-essai par voie orale.

En revanche, il paraît d'ores et déjà primordial de :

- Renforcer les conditions d'application de ce test auprès des laboratoires (notamment au regard de la question des témoins) ;
- Renforcer les contrôles inter-laboratoires.

→ Conclusions et recommandations relatives aux différents tests (I) :

Il ressort de cette analyse que :

- 1- Le bio-essai sur souris présente les meilleures performances pour la mise en évidence d'une toxicité globale au regard de l'ensemble des familles de toxines lipophiles sans être toutefois dénué de points faibles. Il présente l'avantage de couvrir l'objectif de surveillance et indirectement de vigilance et exige des conditions d'application strictes pour sa mise en œuvre ;
- 2- La CL-SM/SM est le test qui présente les performances maximales dans un objectif de surveillance pour les toxines connues qui ne permet pas de remplir l'objectif de vigilance, en routine, pour les toxines inconnues. Il est de plus très exigeant en termes de coût et

²¹ Définition du témoin positif : Bio-essai pratiqué à partir de coquillages provenant d'une zone contaminée.

Définition du témoin négatif : Bio-essai pratiqué à partir de coquillages provenant de marchés.

Des tests d'homogénéité et de stabilité sont systématiquement pratiqués par le LNR comme contrôle de qualité interne.

- de qualification des personnels ; dans le cadre du 6^{ème} PCRD, en collaboration avec le LCR, un projet vise à développer et à valider une méthode multi-toxines lipophiles par CL-SM/SM, dont l'échéance est prévue fin 2007.
- 3- Finalement, le bio-essai souris et la CL-SM/SM poursuivent donc des objectifs complémentaires en termes de surveillance et de vigilance ;
 - 4- Les tests fonctionnels, les tests immunochimiques, les tests immunologiques par chromatographie en flux latéral ne sont pas suffisamment validés, à ce jour, pour être utilisés dans un objectif de surveillance et/ou de vigilance. Des études devraient donc être poursuivies pour essayer de les optimiser et d'en connaître mieux les performances au travers d'essais de validation communautaires notamment coordonnés par le LCR. A cette fin, dans le cadre du 6^{ème} PCRD, 3 projets européens sont en cours pour une échéance fixée autour de fin 2007. Ces outils pourront s'avérer très utiles notamment dans le cadre des auto-contrôles ;
 - 5- S'agissant de la question des témoins, le LNR de l'Afssa produira des procédures pour leur mise en œuvre plus systématique lors des séries d'analyses.

4- S'agissant des recommandations qui peuvent être faites en termes de stratégie opérationnelle

Dans l'immédiat

Dans la mesure où le bio-essai sur souris fournit une évaluation toxicologique globale alors que l'analyse chimique s'intéresse à la détermination des toxines connues, l'obtention de résultats différents n'est pas contradictoire. La méthode chimique permet d'apporter des éléments supplémentaires pour améliorer l'appréciation du risque.

Toutefois, la méthode chimique étant encore en cours de développement et de validation au niveau européen, il en résulte que le bio-essai reste à ce jour, la méthode de référence qui doit fonder la décision de gestion.

Parallèlement

De façon déconnectée de la gestion des zones, il est indispensable, pour les situations atypiques, d'améliorer les connaissances. Pour cela, il est proposé de s'appuyer sur un protocole d'investigation qui permettrait notamment d'apporter des éléments préliminaires sur le potentiel toxique par voie orale des substances à l'origine de la toxicité ou de la situation atypique. Cette démarche permettrait de répondre à un objectif de vigilance adapté.

A l'issue de cette démarche scientifique sur ces cas atypiques, il sera nécessaire de faire un bilan et d'orienter la mise en place de dispositifs de vigilance qui devra porter sur les toxines lipophiles. Il conviendra également de mettre en place un dispositif vis à vis des toxines hydrophiles.

S'agissant de la pertinence de poursuivre ou non les bio-essais sur souris sur le Bassin d'Arcachon au-delà du 15 octobre 2006 compte tenu des derniers résultats disponibles

Actuellement les bio-essais sur le Bassin d'Arcachon sont pratiqués de façon hebdomadaire. Compte tenu de la situation particulière que constitue le Bassin d'Arcachon, les experts considèrent qu'il est justifié de poursuivre les analyses d'eau (flore totale) et de coquillages (bio-essais souris) à une fréquence allégée, soit tous les 14 jours jusqu'au 31 décembre 2006. En effet, dès janvier la surveillance du Bassin sera basée sur les conditions de période à risque. La question se posera à nouveau en février, date de fin de la période à risque, à l'aune des résultats de janvier.

V- Examiner les données épidémiologiques disponibles relatives aux évènements de contamination phycotoxinique des coquillages.

Jusqu'à présent en France, les cas groupés de personnes présentant des symptômes en rapport avec des intoxications phycotoxiques se sont avérés difficiles à recenser avec précision car le contexte clinique de ces épisodes est souvent mal documenté et parce qu'il n'existe de système de surveillance épidémiologique pouvant identifier ce type de pathologie souvent peu spécifique que depuis quelques années en France.

Les symptômes digestifs très fréquents et leur caractère relativement fugace laissent supposer qu'il existe des cas cliniques non déclarés. Les services de l'Etat (DDASS et DDSV principalement) ont parfois connaissance de cas signalés par des consommateurs ou des professionnels pouvant évoquer une intoxication d'origine phycotoxinique mais il est souvent impossible de confirmer la nature et l'origine de la contamination.

Malgré ces difficultés, une étude française signale dès 1976 des cas d'intoxications par phycotoxines paralysantes à la suite de la consommation de moules en provenance d'Espagne (Van Egmond *et al.*, 1993). Plusieurs milliers d'intoxications par phycotoxines diarrhéiques ont été décrites dans le sud de la Bretagne en 1983 (Fremy et Lassus, 2001) puis en 1984 et 1986 à la suite de consommation de moules (Van Egmond *et al.*, 1993). C'est seulement à partir d'épisodes de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) survenus en 1998 et 2000 en France que l'on a pu conclure précisément à la mise en cause de moules produites dans un autre Etat membre qui se sont avérées contaminées en toxines de type diarrhéique (acide okadaïque et dérivés, azaspiracides).

Dans le cas particulier du Bassin d'Arcachon en septembre 2006, à la suite du décès de deux personnes survenu après consommation d'huîtres dans un tableau clinique relativement proche associant une acidose lactique et une insuffisance rénale aiguë, une recherche active de cas présentant un tableau clinique similaire d'étiologie inconnue a été initiée par l'InVS auprès des établissements hospitaliers publics et privés, des centres 15 et des centres antipoison. L'objectif était de recenser tous les cas survenus en France entre le 1er août et le 6 septembre et d'identifier un éventuel facteur de risque commun, en particulier la consommation d'huîtres provenant du bassin d'Arcachon. Aucun signalement correspondant à la définition de cas n'a finalement été transmis à l'InVS.

Parallèlement, un dispositif prospectif de remontée des cas d'intoxication par des huîtres a été mis en place entre le 6 et le 30 septembre auprès des centres antipoison et de toxicovigilance ; La définition de cas était la suivante : « tout trouble survenant dans les 48 heures après la consommation d'huîtres ». Moins d'une dizaine de cas ont été recensés (Source InVS).

Ces quelques chiffres montrent assez clairement qu'il n'est possible d'identifier l'origine phycotoxinique de la maladie avec certitude que lorsqu'elle se situe dans un contexte de TIAC. Dès lors que des cas groupés de personnes sont victimes d'intoxication phycotoxinique dans une même dimension spatiale et temporelle, les investigations épidémiologiques apparaissent remarquablement efficaces et dans des délais très brefs (<24h), un ou deux aliments vecteurs peuvent être identifiés permettant ainsi de remonter rapidement à la source de la contamination. En dehors de cette situation, les cas sporadiques ainsi que les cas liés à la consommation d'un même produit mais non groupés géographiquement, ne peuvent être correctement identifiés en raison principalement du caractère peu spécifique de la symptomatologie et de l'absence de diagnostic biologique de certitude utilisable en routine.

Une vigilance renforcée auprès des services hospitaliers et des unités d'urgence pourrait cependant être mise en place si la symptomatologie devait être sévère ou si l'exposition apparaissait comme étant particulièrement importante. Un recueil des cas prospectif sur une période de temps la plus courte possible (pour ne pas encombrer les systèmes de surveillance nationaux) pourrait alors être mis en place mais la difficulté liée à une définition des cas trop imprécise resterait toujours à surmonter avec pour conséquence une dilution du signal.

→ **Conclusions et recommandations relatives à l'aspect épidémiologique :**

- 1- Il existe actuellement un déficit de données épidémiologiques relatives aux phycotoxines ;
- 2- En règle générale, il paraît plus judicieux de renforcer les moyens mis à disposition pour essayer d'améliorer l'investigation des TIAC à phycotoxines plutôt que de développer un système coûteux de recueil continu des cas d'intoxications phycotoxiniques qui présenterait le risque de n'être pas assez sensible et/ou pas assez spécifique et qui ne disposerait pas de la réactivité suffisante pour mener à bien la gestion de ce type de situation si elle devait survenir à grande échelle ;
- 3- Dans certaines situations très particulières (gravité des symptômes et/ou exposition importante de la population), un recueil de cas réalisé de manière prospective pourrait être mis en place sur la base d'un signal sanitaire de qualité permettant de disposer d'une définition de cas la plus précise possible.

Références :

Frémy JM, Lassus P. (2001). *Toxines d'algues dans l'alimentation*. Paris ; Ifremer.

Van Egmond H. Aune T., Lassus P., Speijers G., Waldock M. (1993). Paralytic and diarrhoeic shellfish poisons : occurrence in Europe, toxicity, analysis and regulation. *Journal of natural toxins*; 2(1):41-83.

Bagnis R. (1992) [Ciguatera in French Polynesian islands: of coral, fish and men]. *Bull Soc Pathol Exot.*;85(5 Pt 2):412-414.

Pohland A. (1990). Algal toxins : general overview. In: al. Pe, ed. *Microbial toxins in foods and feeds*: Plenum press : 531-543.

Problématique « Vibrio »

Les questions instruites ont été les suivantes

1) Y-a-t-il une pertinence scientifique à surveiller mensuellement la détection de *Vibrio parahaemolyticus* au niveau des coquillages et du milieu du Bassin d’Arcachon dans le but de suivre l’évolution de cette présence bactérienne ?

Vibrio parahaemolyticus est un hôte naturel du milieu marin, que l’on peut isoler de l’eau et de plantes ou animaux marins auxquels il s’associe (Colwell, 1984 ; Greenberg *et al.*, 1982). Des études menées dans plusieurs régions du monde ont montré que la prévalence et la densité de cette espèce bactérienne dans l’environnement et dans les produits de la mer étaient directement liées à la température ambiante, avec une forte diminution de l’abondance des populations de vibrions en période hivernale (Baffone *et al.*, 2000 ; Croci *et al.*, 2001 ; Gjerde and Bøe, 1981 ; Oliver and Kaper, 1997 ; West, 1989). Ces micro-organismes ont également la capacité de s’adapter à des conditions environnementales défavorables en entrant en état de vie ralentie (micro-organismes "viabiles mais non cultivables"), rendant alors impossible leur culture sur les milieux classiquement utilisés au laboratoire pour leur isolement (Oliver, 2005).

Ces nombreuses références scientifiques établissent une absence de détection de *V. parahaemolyticus* pendant la période hivernale, liée à la fois à une réelle diminution de la population bactérienne, mais également à des difficultés d’ordre technique à détecter cette espèce bactérienne dans l’environnement marin. Cette non détection dans l’environnement marin ou dans les coquillages ne correspond en aucun cas à une « extinction » de la présence de *V. parahaemolyticus*.

Une telle étude des populations de *V. parahaemolyticus* au niveau des coquillages et du milieu n’a pas été réalisée dans le Bassin d’Arcachon, mais elle conduirait de la même façon à constater une extinction de leur détection en période hivernale. Par ailleurs, en cette période, le risque de prolifération dans les coquillages après récolte des *V. parahaemolyticus* éventuellement présents mais non détectés est faible dans les conditions de stockage à l’air ambiant.

Cette démarche ne semble donc pas pertinente à la fois sur le plan scientifique et en matière de santé publique en cette période de l’année.

2) Y-a-t-il une pertinence scientifique à proposer la mise en place d’une étude pilote au printemps prochain visant à rechercher la présence de *Vibrio parahaemolyticus* dans le Bassin d’Arcachon, à évaluer son éventuel degré d’implantation dans l’environnement et, en cas de présence, à rechercher la présence des gènes d’hémolysines ?

La mise en place d’une étude pilote étalée sur deux ans, à partir du printemps prochain jusqu’à la seconde période hivernale, est réellement pertinente à la fois du point de vue scientifique et du point de vue de la santé publique. Une telle étude, dont le but serait de suivre la dynamique de population de *V. parahaemolyticus* dans le Bassin d’Arcachon, permettrait une amélioration des connaissances utile pour l’évaluation des risques. Plusieurs éléments justifieraient une telle exploration :

1 – Données du CNR : cas français d’infections à *V. parahaemolyticus* confirmés au CNR des Vibrions et du Choléra.

Un bilan des infections à vibrions non cholériques en France entre 1998 et 2005 a montré que, parmi 85 cas recensés au CNR, 13 étaient dus à *V. parahaemolyticus* (*cf.* tableau). Il s’agissait dans la grande majorité des cas de formes graves, qui sont les seules dont le CNR a généralement connaissance. Bien que les deux chocs septiques rapportés ne soient pas liés à la consommation de produits de la mer, la sévérité de ces infections conduit à envisager des investigations sur la problématique liée à *V. parahaemolyticus*.

Souches de *V. parahaemolyticus* responsables d'infections humaines en France reçues au CNR des Vibrions et du Choléra de 1998 à 2005.

N°	Date de réception	Origine géographique	Présence des gènes codant pour les hémolysines		Sexe	Age	Forme clinique. Evolution	Hospitalisation	Terrain prédisposant	Exposition : consommation de produits de la mer	Exposition : contact avec l'eau de mer
1	17/06/98	77	<i>tdh-</i>	<i>trh-</i>	M	72	Choc septique. Décès	OUI	OUI	NON	ND
2	4/09/98	33	<i>tdh-</i>	<i>trh+</i>	M	31	Gastro-entérite. Evolution favorable	OUI	NON	ND	ND
3	13/11/98	12	<i>tdh+</i>	<i>trh-</i>	M	65	Gastro-entérite. Evolution favorable	OUI	NON	OUI	NON
4	27/08/99	2A	<i>tdh+</i>	<i>trh-</i>	M	ND	Gastro-entérite. Evolution favorable	NON	ND	ND	ND
5	15/09/00	76	<i>tdh+</i>	<i>trh-</i>	F	80	Gastro-entérite. Evolution favorable	OUI	NON	OUI	NON
6	20/09/00	75	<i>tdh+</i>	<i>trh-</i>	M	77	Gastro-entérite. Evolution favorable	NON	NON	OUI	NON
7	29/08/03	85	<i>tdh+</i>	<i>trh-</i>	M	59	Gastro-entérite. Evolution favorable	OUI	NON	OUI	ND
8	29/08/03	85	<i>tdh+</i>	<i>trh-</i>	M	38	Gastro-entérite. Evolution favorable	OUI	NON	ND	ND
9	20/10/03	85	<i>tdh-</i>	<i>trh-</i>	M	74	Surinfection de plaie + Septicémie. Choc septique. Décès	OUI	OUI	ND	ND
10	2/08/04	06	<i>tdh+</i>	<i>trh-</i>	M	31	Gastro-entérite. Evolution favorable	NON	NON	OUI	NON
11	2/09/04	56	<i>tdh-</i>	<i>trh+</i>	F	63	Gastro-entérite. Evolution favorable	OUI	OUI	OUI	NON
12	1/10/04	22	<i>tdh+</i>	<i>trh+</i>	F	65	Gastro-entérite. Evolution favorable	NON	NON	OUI	NON
13	1/10/04	17	<i>tdh+</i>	<i>trh-</i>	M	91	Septicémie. Evolution favorable	OUI	OUI	NON	NON

ND : Non documenté

2- Les travaux sur les eaux de la Gironde

Ces travaux ont permis de déterminer la présence d'un pourcentage élevé de souches portant le gène de l'hémolysine TRH (15%) dans les populations de *V. parahaemolyticus* (Robert-Pillot *et al.*, 2004). Des travaux menés dans d'autres régions de France ont également montré la présence de telles souches dans l'eau à des taux plus élevés que ceux habituellement décrits dans la littérature (Bulletin Epidémiologique de l'Afssa, n° 17, juin 2005). Enfin, des souches de *V. parahaemolyticus* ont été mises en évidence dans l'eau et les produits de la mer du bassin d'Arcachon (Urdaci *et al.*, 1988).

3- Données épidémiologiques

Des cas de gastro-entérites à O3:K6, clone pandémique à fort potentiel épidémique, décrit depuis 1996 et responsable d'une constante et régulière progression de l'incidence des infections à *V. parahaemolyticus* dans le monde, ont été mis en évidence sur les côtes atlantiques françaises (Quilici *et al.*, 2005).

Conclusion

Ces différents éléments permettent d'affirmer qu'il y a une pertinence scientifique à mettre en place une étude pilote dans le Bassin d'Arcachon, visant notamment à détecter et à dénombrer *V. parahaemolyticus* à la fois dans les coquillages et dans les eaux, en lien avec des variables environnementales écologiquement pertinentes, et en distinguant les populations de *V. parahaemolyticus* totaux et de *V. parahaemolyticus* pathogènes (recherche des gènes codant pour les hémolysines). Il est en effet important pour l'évaluation du risque de pouvoir relier localement, dans un modèle prédictif, les abondances de *V. parahaemolyticus* totaux et de *V. parahaemolyticus* pathogènes dans les coquillages à leurs abondances dans l'eau de production, ainsi qu'à certains paramètres environnementaux déterminants et faciles à suivre, comme la température de l'eau.

La mise au point d'une PCR quantitative se révélerait particulièrement utile pour cette démarche.

Cette étude serait d'autant plus pertinente si elle permettait d'établir des seuils d'alerte. En l'absence de relation dose-effet établie, ces seuils ne peuvent découler que d'observations liant,

dans le bassin d'Arcachon, fréquence des infections dans la population exposée (générale ou immunodéprimée), fréquence de consommation des coquillages locaux et niveaux d'abondance de *V. parahaemolyticus* dans ces coquillages. Dans la mesure où l'on n'a pas suffisamment de données sur l'incidence des formes modérées des infections à *V. parahaemolyticus* en France, cette étude devrait être corrélée à une amélioration de la surveillance des cas cliniques.

Références

- Baffone, W., Pianetti, A., Bruscolini, F., Barbieri E., Citterio, B. (2000). Occurrence and expression of virulence-related properties of *Vibrio* species isolated from widely consumed seafood products. *Int J Food Microbiol*, 54: 9-18.
- Colwell, R.R. (1984). *Vibrios in the Environment*. Wiley, New York.
- Croci, L., Serratore, P., Cozzi, L., Stacchini, A., Milandri, S., Suffredine, E., Toti, L. (2001). Detection of *Vibrionaceae* in mussels and in their seawater growing area. *Lett Appl Microbiol*, 32: 57-61.
- Gjerde, J., Bøe, B. (1981). Isolation and characterisation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* from the Norwegian coastal environment. *Acta Vet Scand*, 22, 331-343.
- Greenberg, E.P., Dubois, M., Palhof, B. (1982). The survival of marine vibrios in *Mercenaria mercenaria*, the hardshell clam. *J Food Safety*, 4:113-123.
- Oliver, J.D. (1997). The viable but nonculturable state in bacteria.. *J Microbiol*, 43, 93-100.
- Oliver, J.D., Kaper, J.B. (1997). *Vibrio* species. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., and Montville, T.J (Eds.) *Food Microbiology – Fundamentals and Frontiers*. ASM Press. Washington D.C., p. 228-264.
- Quilici M.-L., Robert-Pillot A., Picart J. and Fournier J.-M. (2005). Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 spread, France. *Emerging Infectious Diseases*, 11 (7), 1148-49.
- Robert-Pillot A., A. Guérolé, J. Lesne, R. Delesmont, J-M. Fournier and M.-L. Quilici. (2004). Occurrence and distribution of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from waters and raw shellfish collected in two French coastal areas and from seafood imported into France. *Int. J. Food Microbiol.*, 91, 319-325.
- Urdaci M. C., Marchand M., Grimont P. A. D. (1988). Espèces du genre *Vibrio* associées aux produits marins du bassin d'Arcachon. *Ann. Inst. Pasteur., Microbiol.*, 139, 351-362.
- West, P.A. (1989). The human pathogenic vibrios - A public health update with environmental perspectives. *Epidem Inf*, 103: 1-34.

Conclusion générale de l’Afssa

Tels sont les éléments d’analyse que l’Agence française de sécurité sanitaire des aliments est en mesure de fournir aux autorités sanitaires en réponse aux saisines qui lui ont été adressées.

L’examen approfondi de l’ensemble du dispositif actuel de maîtrise de la consommation des coquillages en France au regard du risque lié aux phycotoxines marines et à *Vibrio parahaemolyticus* a permis à l’Agence d’identifier des marges de progression possibles et ainsi de faire des recommandations de nature scientifique mais également organisationnelle qui figurent dans les encadrés de l’avis.

Les principales recommandations de l’Afssa sont ainsi les suivantes :

<p>Zones de production</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Ne plus sectoriser le Bassin d’Arcachon ; - Mettre en place une étude spatio-temporelle sur un site pilote de façon à mieux cerner le lien entre « indicateur phytoplanctonique » et « contamination phycotoxinique » ; - Renforcer la double surveillance parallèle « Phytoplancton / phycotoxines » en révisant la pertinence des 6 points actuellement surveillés par l’Ifremer ; - Respecter un délai d’une semaine entre deux prélèvements avant réouverture de zone ; - Lancer des travaux pour identifier des critères complémentaires au critère E. coli compte tenu de sa fiabilité imparfaite pour le classement des zones ; - Examiner la pertinence de pomper en zone B l’eau destinée aux établissements conchylicoles pour y déposer des coquillages issus de zone A (ce point sera abordé sur le fond dans l’avis complémentaire relatif aux dangers microbiologiques) ; - Mettre en place un comité de pilotage indépendant du CSTS de l’Ifremer, dans le but de travailler à la définition des zones et périodes à risque, aux modalités d’échantillonnage des zones de production et à tout sujet de nature à impacter sur la sécurité de la consommation des coquillages, tant en période calme qu’en situation de crise.
<p>Mise sur le marché des coquillages</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Disposer de l’appui systématique de l’Afssa pour l’élaboration de l’échantillonnage des plans de surveillance de la DGAI ; - Supprimer les opérations de transfert de coquillages en cas de fermeture de zone, opérations jugées à risque ; - Exiger, tout au long des opérations de re-conditionnement, que figure sur l’étiquetage le lieu d’élevage des coquillages ; - Définir des méthodes d’analyse et identifier les laboratoires compétents pour la conduite des auto-contrôles ; - Finaliser le GBPH de la profession pour la fin de l’année 2006 pour soumission à l’Afssa tout début 2007 ; - Sécuriser les zones de pêche de loisir ; - Assurer une traçabilité sans faille qui permettra notamment de garantir la qualité du retrait des lots contaminés, non assurée actuellement.
<p>Dispositifs palliatifs</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Identifier des critères précis caractérisant une eau de mer « propre » qui n’existent pas actuellement ; - Pomper de l’eau exclusivement à l’extérieur du bassin d’Arcachon

	pour alimenter les zones de stockage protégé, ou utiliser des forages ou de l'eau de mer reconstituée ; - Engager des études sur l'intérêt des traitements de filtration de l'eau (systèmes anti-micro algues).
Tests	- Elaboration par le LNR de l'Afssa de procédures officielles relatives aux témoins positifs et négatifs à utiliser impérativement dans le cadre des bio-essais avec transmission, dans les meilleurs délais, aux laboratoires du réseau ; - Mettre en place, à court terme, un protocole d'investigation , dans le cadre d'un programme de recherche, destiné à (i) tester le bio-essai par voie orale et (ii) situer les tests chimiques par rapport au bio-essai actuel par voie intrapéritonéale ; - Dans cette attente et dans l'attente de la finalisation des travaux communautaires (fin 2007), le bio-essai souris reste le test sur lequel se fondent les mesures de gestion ; - Poursuivre les bio-essais sur le Bassin d'Arcachon toutes les deux semaines jusqu'au 31 décembre 2006 pour la surveillance des toxines lipophiles.
Epidémiologie	- Renforcer le recueil de données épidémiologiques relatives aux toxi-infections alimentaires collectives suspectées d'être en lien avec l'ingestion de coquillages contaminés par des phycotoxines.
Vibrio parahaemolyticus	- Mettre en place au printemps 2007 une étude pilote sur le Bassin d'Arcachon dans le but d'évaluer le degré d'implantation local de Vibrio.

En outre, l'un des points systématiquement identifié lors de l'examen du dispositif est un **défaut général de transmission** des informations entre les différents acteurs concernés. Ce qui conduit en soi à un affaiblissement de l'ensemble du dispositif.

Compte tenu de ce premier constat, l'Afssa recommande les propositions d'évolution et/ou de renforcement du dispositif actuel suivantes (de l'amont vers l'aval) :

- 1- Actuellement, les **prélèvements de coquillages** sont assurés par les professionnels (pour les coquillages qui nécessitent dragage ou plongée) et par l'Ifremer. Dans un objectif de partition et de clarification des missions de chacun, il serait pertinent que les prélèvements soient assurés exclusivement par l'Ifremer et les services de contrôles *ad hoc* ;
- 2- Il paraît indispensable que la définition des **points du réseau Rephy**, au vu du constat qui a été fait dans le présent avis, prenne en compte la localisation des **concessions** des professionnels, ce qui est insuffisamment le cas actuellement. Cette évolution sera de nature à renforcer la sécurité du dispositif, d'une part en assurant une meilleure représentativité de ces points d'intérêt pour le consommateur, d'autre part en renforçant l'adhésion des professionnels à ce dispositif. ;
- 3- S'agissant des **activités de LNR**, plusieurs points sont à souligner :
 - Le LNR de l'Afssa devra avoir une visibilité sur le dispositif relatif à la surveillance du **phytoplancton** dans les laboratoires du réseau, pas tant sur les méthodes elles-mêmes que sur les espèces pertinentes à rechercher et sur l'évaluation des seuils déclenchant la recherche de phycotoxines. En effet, cette étape d'amont est déterminante sur la fiabilité des dispositifs de surveillance et de vigilance pré-cités ;
 - Le LNR doit pouvoir assurer des actions de **formation** auprès des personnels des laboratoires de l'Ifremer et des laboratoires vétérinaires départementaux ;
 - Enfin, la pertinence que le **LNR « microbiologie des coquillages »** se situe à Nantes doit être examinée à l'aulne du positionnement actuel des LNR « Phycotoxines » et

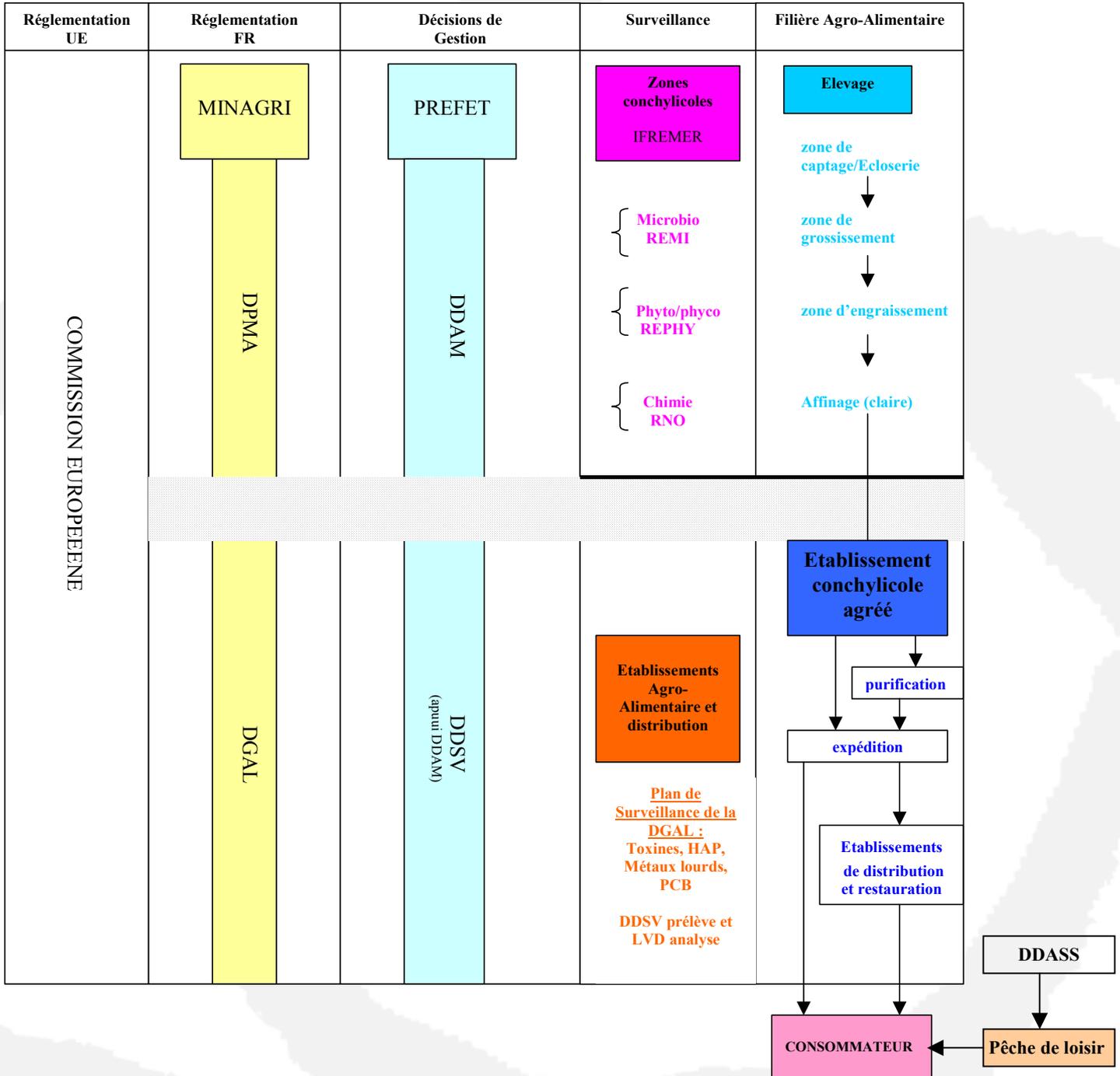
« Métaux lourds Coquillages » intégrés eux à l'Afssa. Dans un souci de cohérence et d'efficacité optimales, une réflexion est nécessaire sur ce point ;

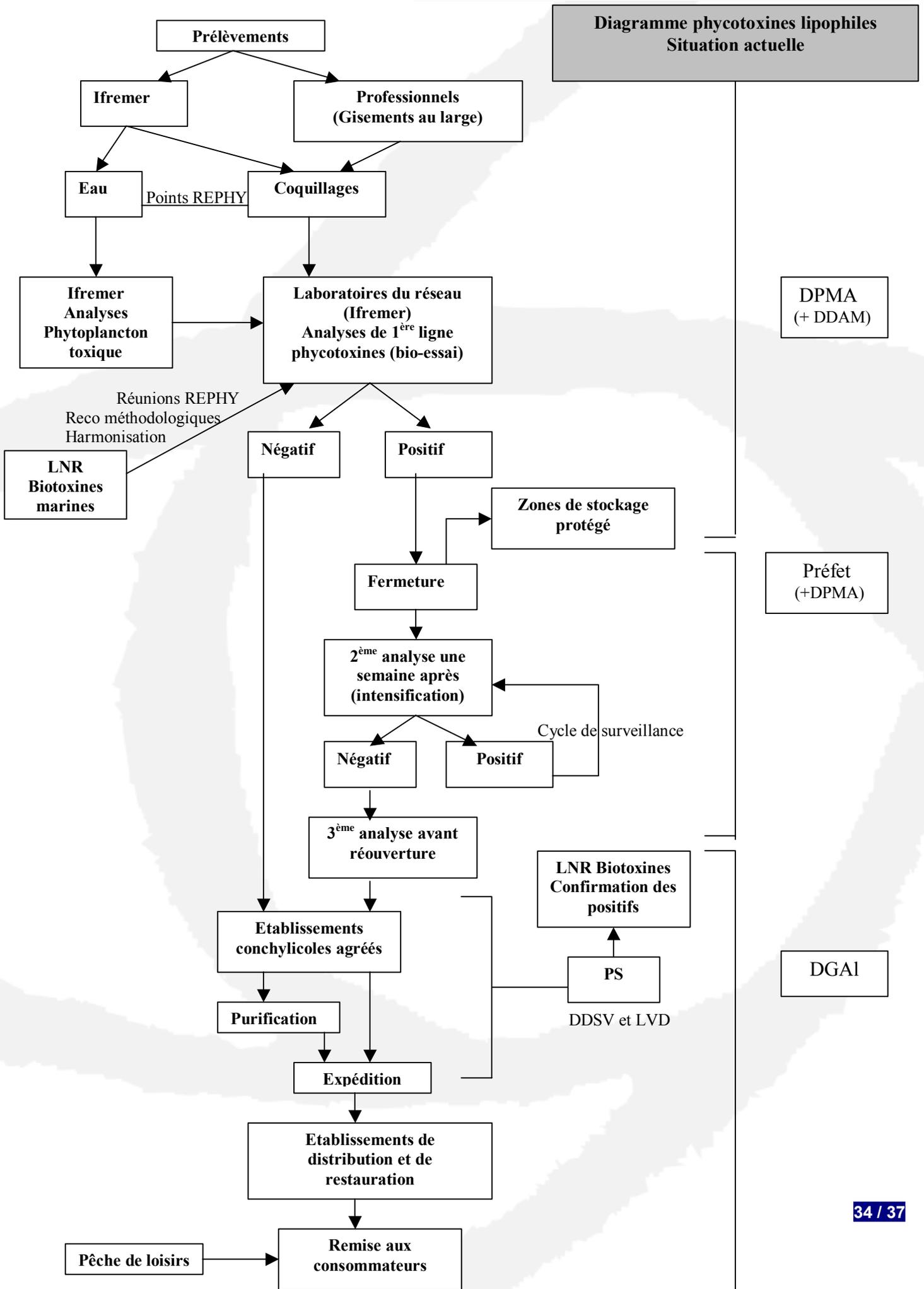
- 4- Il apparaît que le **réseau actuel des laboratoires** de l'Ifremer est largement insuffisant puisque seuls 3 laboratoires sur 7 sont à ce jour accrédités. Les 4 autres laboratoires devraient l'être dans les 18 mois. Or le constat est que le système de surveillance phycotoxinique actuel est déjà saturé en période calme et débordé en situation de crise. Pour remédier à cette situation, dans cette phase intermédiaire de 18 mois, il est urgent de définir des procédures d'agrément temporaire de ces laboratoires non encore accrédités tout en renforçant de façon drastique les contrôles internes.
Il paraît impossible que les laboratoires vétérinaires départementaux faisant partie du réseau puissent à court terme apporter un appui pérenne aux laboratoires de l'Ifremer car ils pratiquent de façon moins régulière les techniques de laboratoire requises pour la recherche de phycotoxines. En revanche, cette piste devrait être explorée pour le long terme moyennant des actions de formation et un encadrement effectif par le LNR ;
- 5- La question centrale de la **stratégie opérationnelle liée à l'usage des tests** disponibles nécessite en soi une analyse spécifique non réalisable de façon aboutie dans le temps imparti pour l'instruction de cette saisine. Cette analyse se poursuivra dans les meilleurs délais et s'appuiera sur les résultats des différents programmes européens actuellement en cours et auxquels l'Afssa participe. Parallèlement à ces travaux pour l'évaluation de nouvelles phycotoxines, des discussions sont engagées au niveau international pour la réévaluation des seuils des phycotoxines déjà réglementées. Selon les conclusions de cette évaluation, les méthodes de détection recommandées pourraient évoluer. Dans cette attente, le bio-essai sur souris, pour les motifs indiqués dans cet avis, reste le test sur lequel se fondent les décisions de gestion ;
- 6- Il est indispensable de continuer à disposer, de façon simultanée, d'un dispositif de **surveillance** efficace pour le contrôle des niveaux de contamination des coquillages en phycotoxines connues et d'un dispositif de **vigilance** destiné à repérer l'émergence de nouvelles phycotoxines potentiellement toxiques pour l'homme. Ce double objectif devra être préservé y compris lorsque la panoplie des tests s'élargira et que le positionnement du bio-essai sera susceptible de changer ;
- 7- Suite aux enseignements qui peuvent être tirés des événements des deux années passées, il paraît utile que les autorités sanitaires mettent en place dès maintenant une **cellule de crise** mobilisable en tant que de besoin selon un dispositif parfaitement arrêté. Il est indispensable que les professionnels soient intégrés à une telle cellule ;

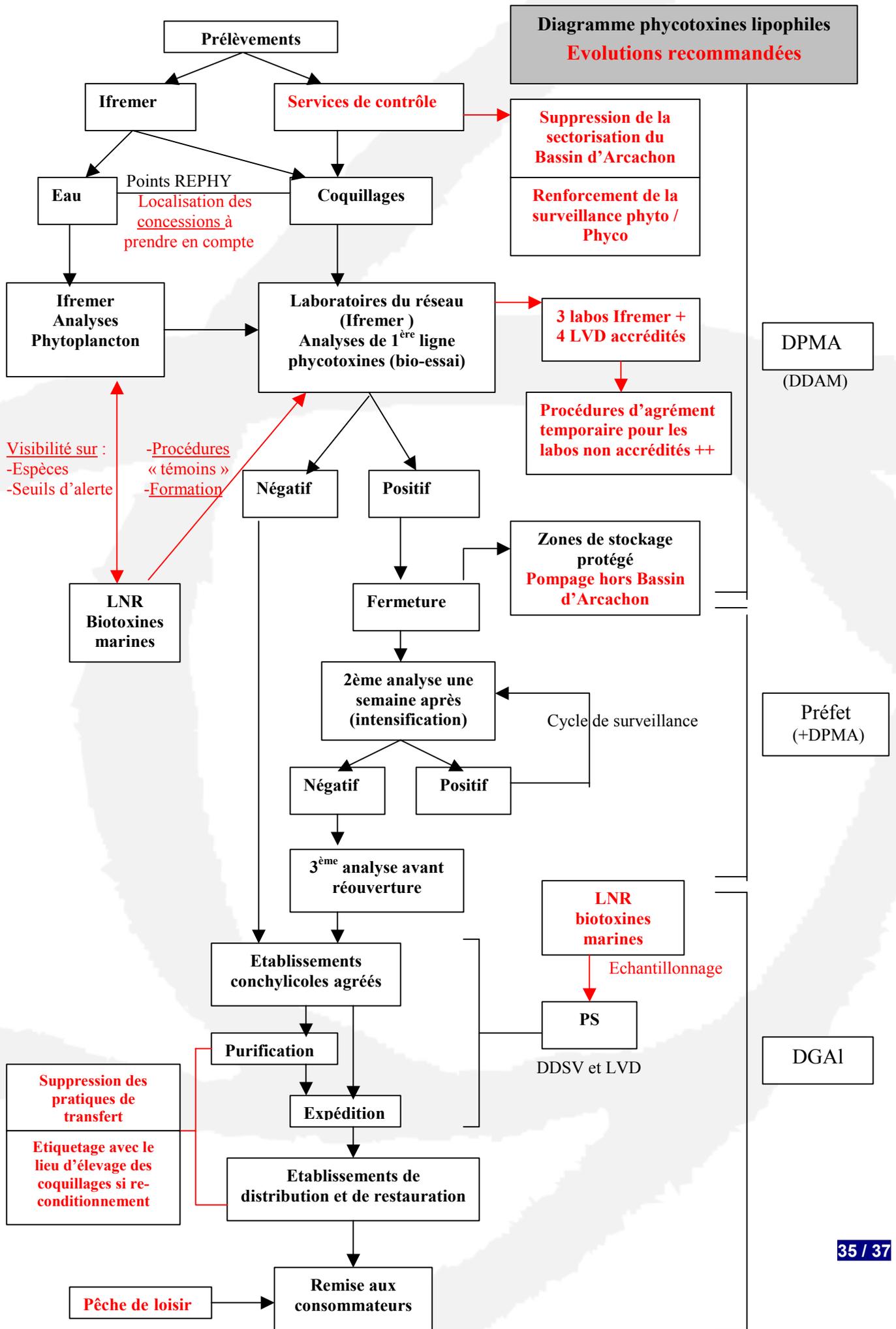
Sur le fondement de l'ensemble de ces éléments, l'Afssa se tient prête à examiner, sur saisine, toute proposition d'évolution de ce dispositif.

Pascale Briand

Annexe 1
Schéma général du dispositif de sécurisation lié à la consommation de coquillages en France







Annexe 2

Propositions du Comité d'experts spécialisé « Résidus et Contaminants Chimiques et Physiques » relatives au bio-essai souris

Dans le cadre de la saisine interministérielle concernant l'évaluation du dispositif de surveillance de la salubrité des coquillages en France, le GECU a consulté le Comité d'Experts Spécialisé (CES) « Résidus et Contaminants Chimiques et Physiques » (RCCP) de l'Afssa en sa séance plénière du 18 octobre 2006 sur la question relative au bio-essai souris.

Après avoir discuté point par point de l'intérêt et les limites du test, dans le dispositif de surveillance, le CES RCCP estime que celui-ci permet de détecter des toxines connues ou inconnues et que l'on dispose de plus de 30 ans de recul. Il est indispensable de préciser les limites du terme « bio-essai souris » qui constitue dans le cas présent un test diagnostique destiné non pas à évaluer un risque mais à constituer un signal d'alerte fondant, à ce jour, la décision de gestion. Il serait cependant nécessaire de mettre en place des contrôles qualité internes (dont le contenu sera défini par le LNR) en vue de disposer de références communes inter-laboratoires.

Par ailleurs, bien que le seuil de salubrité soit réglementairement fixé aujourd'hui à la mortalité de 2 souris sur 3, la prise en compte de cas de mortalité d'une seule souris ou la présence d'effets cliniques plus ou moins sévères chez tous les animaux devraient conduire à des investigations supplémentaires systématiques pour lever toute incertitude (protocole d'analyse chimique à définir).

Concernant le rapport du GECU, des amendements apparaissent nécessaires en particulier d'apporter des clarifications sur le nombre d'animaux utilisés dans les tests en faisant apparaître les protocoles d'utilisation de témoins négatifs et positifs, de substituer les termes « faux positifs » et « faux négatifs », par « *échantillon non conforme dont le danger n'a pas été identifié* » et « *échantillon conforme pour lequel les analyses chimiques révèlent une teneur en toxine lipophile supérieur au seuil* », de supprimer le paragraphe traitant de facteur de sécurité, compte tenu des sources potentielles de confusion qu'il pourrait introduire au regard d'un test de dépistage. Par ailleurs, il faudrait intégrer un test souris par voie orale dans le tableau mettant en perspective les différents tests par rapport à un test idéal. Une réflexion supplémentaire doit être menée pour consolider l'algorithme proposé par le GECU pour mettre en perspective les étapes de gestion et celles de recherche en cas de toxicité atypique (échantillon non conforme dont le danger n'a pas été identifié).

Au bilan, aucun élément majeur n'a été mis en évidence pour remettre en cause le protocole actuel du bio-essai souris ; un test par voie orale pourrait être préconisé dès lors qu'on l'assortirait de considérations toxico-cinétiques en vue de minimiser les erreurs d'interprétation.

Annexe 3 Liste des abréviations

AESA : autorité européenne de sécurité des aliments
Afssa : agence française de sécurité sanitaire des aliments
AO : acide okadaïque
AZA : azaspiracides
CL-SM/SM : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
CNR : coordination nationale des réseaux
COFRAC : comité français d'accréditation
CSTS : Comité Scientifique et Technique de la Surveillance
DDAM : direction départementale des affaires maritimes
DDASS : direction départementale des affaires sanitaires et sociales
DDSV : direction départementale des services vétérinaires
DGAI : direction générale de l'alimentation
DGS : direction générale de la santé
DGCCRF : direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes
DPMA : direction des pêches maritimes et de l'aquaculture
DTX : dinophysistoxines
FAT : neurotoxines à action rapide (ou « Fast Acting Toxins »)
GECU : groupe d'expertise collective d'urgence
GBPH : guide de bonnes pratiques d'hygiène
i.p. : intrapéritonéale
LCR : laboratoire communautaire de référence
LNR : Laboratoire National de Référence
MAP : ministère de l'agriculture et de la pêche
MEDD : ministère de l'écologie et du développement durable
OAV : office alimentaire et vétérinaire
PCRD : programme-cadre de recherche
PTX : pecténotoxines
REMI : réseau de surveillance microbiologique
Rephy : réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines
SPX : spiroïdes
TIAC : toxi-infections alimentaires collectives
YTX : yessotoxines