



Maisons-Alfort, le 05 juin 2008

NOTE

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relative à la consommation de produits alimentaires en présence d'efflorescence de cyanobactéries

LA DIRECTRICE GÉNÉRALE

1. RAPPEL DE LA SAISINE

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 12 juillet 2007 par la Direction générale de la santé (DGS) d'une demande d'actualisation du rapport Afssa/Afsset de juillet 2006 intitulé « Evaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries et leurs toxines dans les eaux destinées à l'alimentation, à la baignade et autres activités récréatives », sur les plans analytique et toxicocinétique dans le réseau trophique aquatique.

2. CONTEXTE

La consultation de l'Afssa fait suite à l'observation d'efflorescences de cyanobactéries lors des années 2005 et 2006, dans certains départements français. Ces efflorescences ont conduit à l'interdiction des activités de pêche de loisirs en même temps que les autres activités récréatives (baignade, activités nautiques). Les plans d'eau touchés par cette mesure n'ont pas été rouverts aux activités de pêche sur la base du principe de précaution (risque lié à la consommation de poissons ayant pu bioaccumuler des toxines).

3. QUESTIONS POSEES

La présente note d'appui scientifique et technique effectue l'état des connaissances sur :

- la bioaccumulation et la détoxification des cyanotoxines dans diverses espèces aquatiques et la distribution des toxines dans les organes ;
- les méthodes disponibles de détection et quantification des toxines (essentiellement les microcystines et secondairement les nodularines) ;
- les risques sanitaires liés à la présence de cyanotoxines dans les denrées alimentaires (poissons).

4. METHODE D'EXPERTISE

L'expertise a suivi la méthode suivante :

- analyse de la note GGS/EA3/N° 07-234 et du rapport Afssa/Afsset « Evaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries et leurs toxines dans les eaux destinées à l'alimentation, à la baignade et autres activités récréatives » (juillet 2006) ;
- recherche de publications récentes (jusqu'à mars 2008) concernant la détection et le devenir des cyanotoxines chez les espèces aquatiques pouvant être consommées, poissons, mollusques et crustacés, en particulier.

L'expertise s'est appuyée sur le rapport commun de spécialistes de l'Ifremer, de l'Inra et de deux laboratoires de l'Afssa : le Laboratoire d'études et de recherches sur la qualité des aliments et les procédés agroalimentaires (LERQAP), Unité Toxines, polluants organiques et pesticides et le Laboratoire d'études et de recherches sur les médicaments vétérinaires et désinfectants (LERMVD), Unité de Toxicologie.

5. BIOACCUMULATION ET DETOXICATION DES CYANOTOXINES CHEZ DIVERSES ESPECES AQUATIQUES

Pour rappel, les cyanotoxines ou toxines de cyanobactéries (microalgues bleu-vertes des milieux dulçaquicole, saumâtre et marin) recouvrent une grande variété de structures chimiques et de mécanismes d'action. En fonction de ce dernier, les cyanotoxines sont classées en hépatotoxines (microcystines, nodularines, cylindrospermopsines et analogues), en neurotoxines (anatoxines, saxitoxines et dérivés), en dermatotoxines à effet irritant (lyngbyatoxines, aplysiatoxines) (cf Rapport Afssa/Afssset, 2006).

Les informations disponibles concernant les concentrations de cyanotoxines mesurées chez différentes espèces de poissons, de mollusques, de crustacés et d'autres invertébrés aquatiques ont été récemment revues par Ibelings et Chorus (2007).

Ce type de données apparaît très important pour améliorer la description de la bioaccumulation¹ des toxines et ainsi aider à définir le risque en termes de consommation humaine. En effet, un certain nombre de travaux disponibles aujourd'hui permet de préciser les niveaux de toxines retrouvés, leur répartition dans les différents organes et les espèces qui bioaccumulent au sein du réseau trophique. Il apparaît ainsi que les organismes peuvent accumuler les toxines par le biais de deux voies principales : la pénétration par voie « transcutanée » des toxines dissoutes et l'ingestion par la prise de nourriture, soit de manière directe pour les espèces phytoplanctonophages (zooplancton, mollusques, et poissons herbivores), soit de manière indirecte pour les espèces des niveaux trophiques supérieurs (poissons carnivores et omnivores, vertébrés aquatiques). Il est actuellement reconnu que la voie d'exposition alimentaire, qu'elle soit directe ou indirecte, est prépondérante par rapport à la voie transcutanée.

5.1. Zooplancton

Le zooplancton peut consommer des cyanobactéries toxiques, que celui-ci soit composé d'organismes plutôt détritivores comme les protozoaires (Cole et Wyne, 1974) ou les rotifères (Fulton et Pearl, 1987 ; Gulati *et al.*, 1993 ; Rothhaupt, 1991), ou à tendance herbivore comme les cladocères (Demott, 1999) ou certains copépodes (Kurmayer et Jüttner, 1999). Quelques études récentes ont mis en évidence des phénomènes d'accumulation des microcystines dans les organismes zooplanctoniques (Watanabe *et al.*, 1992 ; Laurén-Määttä *et al.*, 1995 ; Kotak *et al.*, 1996 ; Mohamed, 2001 ; Ferrao-Filho *et al.*, 2002 ; Oberhaus *et al.*, 2007).

Thostrup et Christoffersen (1999) ont montré expérimentalement que les daphnies (petits crustacés) pouvaient accumuler jusqu'à 24,5 µg de microcystine par gramme de poids sec et qu'elles pouvaient ainsi significativement contribuer au transfert de ces toxines vers le poisson. Cependant, le zooplancton est susceptible de détoxifier une partie de ces toxines cyanobactériennes comme le suggère Thostrup et Christoffersen (1999) mais peu de données sont disponibles sur ce phénomène.

Concernant les nodularines, trois publications ont montré leur possible transfert chez les crevettes et les poissons *via* le zooplancton (Engström-Öst *et al.*, 2002, Karjalainen *et al.*, 2005, Karjalainen *et al.*, 2006).

¹ Bioaccumulation : processus par lequel se produit une concentration des cyanotoxines dans les tissus des organismes aquatiques par rapport à la concentration dans l'eau, résultant de l'absorption par les différentes voies d'exposition.

5.2. Mollusques

Concernant les mollusques bivalves d'eau douce, il a été montré qu'il y avait bioaccumulation de cyanotoxines chez des moules d'eau douce, de l'espèce *Anodonta cygnea* (Saker *et al.*, 2004). En effet, ces moules exposées pendant 16 jours aux cyanobactéries du genre *Cylindrospermopsis* accumulent la cylindrospermopsine à des concentrations supérieures à $2,52 \mu\text{g.g}^{-1}$ de tissus. Les concentrations rapportées dans l'hémolymphe peuvent atteindre $61,5 \mu\text{g.g}^{-1}$ de tissus, soit $408 \mu\text{g.L}^{-1}$, alors que la concentration maximale dans l'environnement est de $90 \mu\text{g.L}^{-1}$. Les toxines paralysantes, encore appelées saxitoxines, peuvent également être produites par des cyanobactéries comme *Aphanizomenon issatschenkoi* (Pereira *et al.*, 2004). Des moules d'eau douce (*Anodonta cygnea*) exposées à ces cyanobactéries toxiques ont accumulé les saxitoxines dès le 2^{ème} jour et ont atteint un niveau de l'ordre de $26 \mu\text{g}$ pour 100g le 7^{ème} jour. Les viscères sont l'organe contenant la plus grande proportion (78%) des toxines au début de l'accumulation alors que les niveaux ont augmenté dans les autres tissus (branchies, manteaux, pieds) au cours du temps. Ces moules ont montré une courbe d'épuration classique en forme de S, ce qui correspond à une décroissance lente pendant une première courte période, suivie par une décroissance rapide puis lente des toxines. Après 14 jours d'épuration, les toxines ont été trouvées à l'état de traces voire n'ont plus été détectées.

Des dresseines (*Dreissena polymorpha*), autre espèce de moules d'eau douce d'un lac des Pays-Bas, exposées à une alimentation unique à partir de cyanobactéries toxiques du genre *Microcystis* ont atteint des niveaux de l'ordre de $11 \mu\text{g.g}^{-1}$ de poids sec (ps) de microcystine-LR en 1 semaine et uniquement de l'ordre de $3,9 \mu\text{g.g}^{-1}$ ps avec une alimentation mixte et au bout de 3 semaines (Dionisio Pires *et al.*, 2004).

Chez le bivalve d'eau douce, *Unio douglasiae*, il a été montré que l'élimination des microcystines est très lente et que celles-ci peuvent persister dans les tissus pendant l'automne et l'hiver suivants la prolifération (Yokoyama and Park, 2003). En revanche, l'étude de Dionisio Pires *et al.* (2004) sur des moules d'eau douce (dresseines) *Dreissena polymorpha* contaminées à $11 \mu\text{g.g}^{-1}$ ps par de la microcystine-LR a montré une réduction rapide de sa concentration jusqu'à des niveaux bas et qu'il ne subsistait que de très faibles valeurs de toxines après 3 semaines d'épuration.

Même si ces mollusques d'eau douce ne sont pas forcément consommés par l'homme, ils constituent un maillon alimentaire pour les organismes supérieurs et peuvent entrer dans le transfert de ces toxines jusqu'à l'homme.

Concernant les mollusques bivalves marins, l'accumulation de nodularine R dans des moules (*Mytilus edulis*) de la mer Baltique a été mesurée à des niveaux compris entre 12 et $80 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Cette même nodularine R a été retrouvée dans des canards (*Somateria mollissima*) consommant ces moules, dans le foie à des niveaux compris entre 3 et $48 \mu\text{g.kg}^{-1}$, et dans les plumes à des niveaux entre 8 et $43 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ps (ce qui suggère que la toxine dissoute se fixe aussi par contact externe sur les plumes). Ce travail montre de nouveau que le transfert des toxines et sa vectorisation à l'homme ne doivent pas se limiter au seul réseau trophique aquatique (Sipiä *et al.*, 2008).

Selon Kankaanpaa *et al.* (2007), l'élimination de la nodularine accumulée dans *Mytilus edulis* est également rapidement initiée mais une période de 144 h en eau claire reste insuffisante pour épurer toute la toxine accumulée. Une expérimentation en mésocosme menée par Stroglyoudi *et al.* (2006) montre une rapide accumulation de nodularine en une douzaine d'heures d'exposition à *Nodularia spumigena*. Les moules exposées pendant 5 jours, montrent une diminution de la teneur en toxines dans les tissus le 2^{ème} jour puis une stabilisation les jours suivants. Ces résultats suggèrent que les moules maintiennent un niveau bas de toxines grâce à des mécanismes d'excrétion et/ou de métabolisation performants. Après 72 h d'épuration, la teneur en nodularine a diminué de 75%.

Un travail très récent (Laurent *et al.*, 2008) a mis en évidence en zone tropicale (Nouvelle Calédonie) que des intoxications de type ciguatérique peuvent être causées par la consommation de mollusques (bénitier du genre *Tridacna*) et de poissons contaminés par des toxines de cyanobactéries benthiques marines. Les contaminations des mollusques et des poissons par des cyanotoxines telle l'anatoxine-a semblent survenir dans des zones où d'importants tapis cyanobactériens se développent, en liaison avec la dégradation de certains lagons sous l'action de l'homme ou de phénomènes naturels tels que les cyclones.

Concernant les gastéropodes d'eau douce, la bioaccumulation de cyanotoxines a aussi été démontrée chez un escargot aquatique, *Melanoides tuberculata* (White *et al.*, 2006) de même que chez la limnée, *Lymnea stagnalis* (Lance *et al.*, 2006). Des processus de détoxification ont également été montrés chez cette limnée : 64 % des toxines avaient disparu au bout d'une semaine (Lance *et al.*, 2006), et une élimination presque totale des toxines a été observée 30 jours après l'exposition par Zurawell *et al.* (2006).

5.3. Crustacés et poissons

Concernant les crustacés, deux publications mettent en évidence que les écrevisses d'eau douce (*Pacifastacus leniusculus* et *Procambarus clarkii*) sont capables d'accumuler des microcystines dans leur hépatopancréas et leur intestin (Liras *et al.*, 1998 ; Vasconcelos *et al.*, 2001). Cette localisation diminue le risque d'intoxication dans le cas où ces organes ne seraient pas consommés (Vasconcelos *et al.*, 2001).

Concernant les poissons, Soares *et al.* (2004) ont montré que le tilapia, *Tilapia rendalli*, était capable d'accumuler dans le tissu musculaire des quantités de microcystines le rendant impropre à la consommation. Selon Cazenave *et al.* (2005), l'accumulation de microcystines RR dans le muscle de poisson apparaît peu de temps (24h) après exposition à 50 µg.L⁻¹ de microcystines RR dans l'eau, et une augmentation de cette accumulation a été montrée avec le temps dans le muscle de poissons exposés de façon chronique à des efflorescences de cyanobactéries.

Concernant la toxicocinétique et l'élimination (donc l'épuration ou détoxification des tissus) des cyanotoxines, des travaux ont été publiés récemment, mais les informations disponibles restent parcellaires.

Mohamed et Hussein (2006) ont examiné les capacités de détoxification des microcystines chez l'espèce de tilapia, *Oreochromis niloticus*, en mésocosme. Ils ont ainsi montré que les poissons étaient capables d'éliminer les toxines en les excréant *via* la bile. En effet, la concentration maximale dans l'eau (1,2 µg.L⁻¹) a été observée 96 heures après le début de la phase d'épuration. Ces données démontrent une capacité des poissons à se débarrasser des toxines.

Smith et Haney (2006) ont montré que, chez la perche soleil (*Lepomis gibbosus*) nourrie avec du zooplancton toxique contenant des microcystines, les concentrations en toxines diminuaient dans le foie et le tissu musculaire après une période de 6 jours d'accumulation. Ces résultats suggèrent l'existence chez cette espèce de mécanismes de détoxification et/ou d'excrétion. Ces mêmes auteurs ont montré cependant que, chez des poissons contaminés transférés dans une eau non contaminée, les concentrations en toxines restent constantes dans le foie et le muscle sur une période de 15 jours. D'autres auteurs ont aussi montré que des fortes concentrations en toxines pouvaient être observées dans le muscle de poisson alors que les animaux ne sont plus exposés aux cyanobactéries toxiques (Ibelings and Chorus, 2007 ; Kankaanpaa *et al.*, 2002). Cependant Xie *et al.*, 2004 ont, quant à eux, montré l'efficacité d'une détoxification d'une durée équivalente (deux semaines), mais chez une autre espèce, la carpe argentée (« silver carp ») *Hypophthalmichthys molitix*. Ces mêmes auteurs rapportent cependant que le processus d'épuration apparaît plus lent pour les tissus musculaires que pour les autres parties de l'animal.

Ainsi, il apparaît que le temps d'exposition des animaux est un facteur très important qui intervient de manière significative sur les concentrations retrouvées dans les poissons. Le temps nécessaire à la détoxification est aussi un élément à prendre en compte et qui fait intervenir l'espèce de poissons et la nature du tissu.

Sur la possibilité d'un phénomène de biomagnification², les résultats des études divergent. Une étude réalisée en Chine chez différentes espèces de poissons d'eau douce montre que les teneurs de microcystine étaient relativement faibles dans les tissus et organes de la carpe argentée (« silver carp ») *Hypophthalmichthys molitix*, un animal se nourrissant de phytoplancton, alors qu'elles étaient plus élevées chez des espèces carnivores ou omnivores (Xie *et al.*, 2005) .

Cette étude est en contradiction avec ce qui était précédemment admis : A savoir que les poissons herbivores ou consommant du plancton comme les cyprinidés possèdent un iléon beaucoup plus long que les poissons carnivores. Cela est associé chez les premières espèces à une plus grande surface de contact et des capacités d'absorption plus importantes. Ces

² Biomagnification : transfert des cyanotoxines d'un aliment à un organisme, résultant en une concentration en toxines plus importante dans l'organisme par rapport à son aliment. Le résultat est une concentration en toxines au fur et à mesure de la montée dans la chaîne alimentaire.

caractéristiques pourraient laisser suspecter que les espèces non carnivores soient plus capables d'accumuler des cyanotoxines, ce qui va à l'encontre de ce qui a été décrit par Xie *et al.* (2005). Par ailleurs, Carbis *et al.* (1997) ont rapporté que le pH neutre ou légèrement basique du tractus gastro-intestinal de la carpe, *Cyprinus carpio*, limitait l'absorption de microcystine, les cyanobactéries étant digérées uniquement dans un environnement acide. Du fait de cette divergence, il n'est pas possible d'établir une corrélation claire entre le mode d'alimentation de poissons (planctivores ou herbivores *versus* omnivores ou carnivores) et des concentrations de toxines observées dans leurs tissus respectifs.

6. DISTRIBUTION DES TOXINES DANS LES ORGANES

6.1. Mollusques

Chez plusieurs espèces de coquillages bivalves d'eau douce, les microcystines ont été retrouvées dans le glande digestive, les viscères, les gonades, les branchies et le pied (Chen and Xie, 2005a). Zhang *et al.* (2007b) ont mesuré les teneurs en 3 microcystines (RR, YR et LR) dans les différents organes d'escargots d'eau douce (*Bellamyia aeruginosa*) exposés à des efflorescences denses de *Microcystis*. Pour la première fois, ils ont mis en évidence la transmission physiologique de ces microcystines dans la progéniture des escargots. La plus grande partie des toxines était présente dans les intestins (53,6%) et dans la glande digestive (29,9%), tandis que les autres tissus en contenaient seulement 16,5%. Chez la limnée (*Lymnea stagnalis*) 95 % des microcystines ont été retrouvées dans le complexe formé par les glandes digestives et génitales. Un autre travail réalisé chez *Lymnea stagnalis jugularis* a de son côté montré que les microcystines étaient plutôt présentes dans le tractus digestif et dans une moindre mesure dans la glande digestive (Zurawell *et al.*, 2007).

Concernant les bivalves d'eau de mer, une étude rapporte que la nodularine s'accumule rapidement dans la moule *Mytilus edulis* et les plus fortes concentrations sont retrouvées dans la glande digestive. Celle-ci contient 1,4 à 1,8 fois plus de nodularine que les autres tissus mous (Kankaanpaa *et al.*, 2007).

6.2. Poissons

Certains auteurs ont montré que les plus fortes concentrations en microcystines étaient retrouvées dans l'intestin et le foie des poissons et que des concentrations plus faibles étaient observées dans d'autres organes, les concentrations les plus faibles étant rapportées pour le muscle (Xie *et al.*, 2005 et 2007). Zhang *et al.* (2007a) ont montré que la concentration en microcystines était différente en fonction des tissus : 6,49 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids frais dans les intestins ; 4,52 $\mu\text{g.g}^{-1}$ dans le foie et 2,86 $\mu\text{g.g}^{-1}$ dans le muscle. Ils ont également détecté des toxines dans les reins, mais à un moindre niveau (1,35 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids frais) et rapportent une absence de détection dans la graisse. Cependant, Chen *et al.* (2006 a et b) indiquent que, en terme de charge en toxines, le muscle représente 5 à 7% juste après les intestins (autour de 90%) et avant le foie (environ 1%).

Il n'apparaît pas possible d'établir une corrélation entre le contenu en microcystines des hépatopancréas ou des foies et celui des muscles pour divers organismes tels que des crevettes (Chen and Xie, 2005b) et la perche soleil (Smith and Haney, 2006) alors qu'elle a pu être observée pour les carpes Chen *et al.* (2006 a et b).

7. ANALYSE QUANTITATIVE DES CYANOTOXINES CHEZ DIVERSES ESPECES AQUATIQUES

L'essentiel des méthodes porte sur la détection des microcystines et secondairement des nodularines par LC/MS et LC/UV. En dehors de la LC/MS et LC/UV, il est fait mention de l'utilisation de méthodes ELISA. Ces méthodes sont assez largement utilisées pour leur sensibilité mais elles ont tendance à donner des résultats surévalués en raison de réactions croisées avec d'autres analogues et/ou d'autres molécules de la matrice, qui ne sont pas forcément toxiques pour le consommateur.

Un paramètre critique considéré pour la fiabilité des méthodes analytiques est qu'une partie des microcystines dans les tissus puisse y être liées de façon covalente et être de ce fait difficilement extractibles. En effet les méthodes de quantification (LC/MS, LC/UV et ELISA) qui sont utilisées dans les publications pour les microcystines ne permettent pas de doser cette partie des toxines liée de façon covalente aux tissus mais uniquement la partie des toxines libres. Une étude portant sur les échantillons de foie et de sérum de personnes décédées lors de l'intoxication par hémodialyse de Caruaru (Brésil) indique que la technique de conversion du groupe ADDA en MMPB (oxydation de Lemieux), qui prend en compte les microcystines libres et liées, suivie par une détection en GC/MS a conduit à la détection de concentrations en microcystines plus élevées que celles obtenues par les techniques ELISA et LC/MS (Yuan *et al.*, 2006).

Il apparaît ainsi très important de pouvoir disposer de données permettant de savoir si ces microcystines liées représentent véritablement un risque pour le consommateur et notamment connaître leur biodisponibilité. Ibelings et Chorus (2007) avancent qu'il est peu probable que les microcystines liées soient biodisponibles. La confirmation de ce point doit être une priorité scientifique afin de pouvoir évaluer le risque de manière adéquate et régler définitivement le problème de méthode à appliquer pour quantifier de manière satisfaisante les microcystines.

Les techniques LC/MS et LC/UV s'avèrent efficaces pour détecter et quantifier la nodularine.

Néanmoins pour les méthodes basées sur la LC/MS, il est particulièrement important que soient évalués les effets matrices, connus pour influencer sur la fiabilité des résultats (par suppression ou d'augmentation du signal). De façon générale, il est important que toute méthode mise au point pour la détection des cyanotoxines soit tout au moins validée voire normalisée.

8. RISQUES SANITAIRES LIES A LA PRESENCE DE CYANOTOXINES DANS LES DENREES ALIMENTAIRES (POISSONS)

Quelques auteurs ont tenté de réaliser une évaluation des risques alimentaires liés à la présence de cyanotoxines dans les denrées alimentaires (poissons). Pour cela, ils se sont basés sur la dose journalière tolérable (DJT) de la microcystine-LR (la seule valeur toxicologique de référence disponible pour les cyanotoxines), une consommation journalière de poisson et un poids moyen pour l'homme. Il est à regretter que certains auteurs aient confondu la notion de DJT avec celle de "teneur maximale". En effet, Magalhaes *et al.* (2003) et Chen *et al.* (2006, 2007) ont directement comparé la concentration de microcystine dans la chair des poissons et des crustacés avec la DJT.

D'autres auteurs ont calculé des teneurs maximales (qu'ils appellent "valeurs guides") en microcystine dans la chair de poisson selon 2 hypothèses : avec et sans prise en compte de l'apport par l'eau (Ibelings and Chorus, 2007). En effet, 80% du crédit toxicologique a déjà été utilisé par l'OMS pour établir la limite maximale dans l'eau de boisson à 1µg/L. Suivant leur concept, les valeurs par défaut pertinentes pour la population générale française sont : poids corporel moyen de 60 kg (au lieu de 75 kg dans leur étude), consommation journalière de poisson de 86 g (le P95 de la consommation française est en effet de 600 g par semaine selon les données INCA-1 (Volatier, 2000)), prise en compte de l'apport par l'eau. La valeur guide ainsi calculée serait de 5,6 µg de microcystine/kg de poisson pour protéger les adultes de la population générale. Mais pour protéger les enfants, elle devrait être de 1,4 µg/kg (poids corporel moyen de 10 kg et consommation journalière de 57 g selon INCA-1). Ce qui permettrait également de protéger les adultes forts consommateurs de produits de la mer, dont le P95 de consommation de poisson est autour de 220 g (données de l'étude CALIPSO ; Leblanc, 2006) et conduirait à une valeur guide de 2,2 µg/kg.

Ibelings et Chorus (2007) proposent également des valeurs guides basées sur une dose de référence aiguë ou une dose de référence saisonnière, correspondant à une exposition pendant une seule journée ou quelques semaines, au lieu de la DJT qui est une dose de référence établie pour une exposition pendant la vie entière. Afin de pouvoir évaluer la pertinence de retenir ces valeurs de référence aiguë ou saisonnière, il serait nécessaire de connaître avec précision les conditions d'exposition de la population française et de s'assurer que la présence de

cyanotoxines dans les coquillages, les crustacés et les poissons est réellement limitée à quelques jours dans l'année.

Des valeurs d'alertes ont aussi été proposées pour la nodularine et la cylindrospermopsine (Van Buynder *et al.*, 2001; Saker *et al.*, 2004) mais les connaissances trop parcellaires de la toxicité des ces toxines ne permet pas d'avoir un niveau de confiance suffisant pour évaluer la pertinence des valeurs proposées.

9. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AFSSA

Les données disponibles dans la littérature scientifique concernent principalement les microcystines et secondairement les nodularines.

Au vu des informations parcellaires quant à la toxicocinétique des cyanotoxines chez les poissons, il reste très difficile de définir leur devenir dans les tissus après leur accumulation au cours d'un épisode toxique. Ainsi, la bioaccumulation ne peut être considérée qu'en prenant également en compte les processus de biotransformation.

La majorité des microcystines liées n'est pas quantifiée dans les publications référencées et seules les quantités de microcystines libres sont donc estimées. Cependant, le devenir des microcystines liées dans les différents organes et en particulier le muscle, suite à la digestion dans le tractus digestif humain n'est pas connu. La détermination de la biodisponibilité de ces microcystines liées doit être une priorité scientifique afin de pouvoir évaluer le risque sanitaire pour le consommateur de manière adéquate et régler définitivement le problème de méthode à appliquer pour quantifier de manière satisfaisante les microcystines.

Il faut également signaler que la plupart des travaux concernent les poissons d'Asie (essentiellement en Chine) et que les valeurs disponibles retrouvées dans les différents organismes ne sont peut-être pas représentatives de la situation européenne et plus particulièrement française. Aussi l'extrapolation semble délicate.

Il en ressort que, même parcellaires, les données disponibles montrent qu'en cas de contamination du milieu aquatique il peut être observé :

- une contamination des mollusques d'eau douce qui, même s'ils ne sont pas consommés directement par le consommateur français, constituent un maillon alimentaire pour les organismes supérieurs et peuvent entrer ainsi dans le transfert de ces toxines jusqu'à l'homme ;
- une contamination de mollusques bivalves marins, notamment les moules de l'espèce commune *Mytilus edulis* ;
- une contamination significative des muscles de poissons d'eau douce.

Concernant le risque alimentaire lié à la présence de cyanotoxines dans les denrées alimentaires, là encore une approche ne peut être réalisée que pour la microcystine-LR. L'établissement de valeurs guides est assujéti à l'alternative de prendre en compte ou non l'apport par l'eau : sachant que 80% du crédit toxicologique a déjà été utilisé par l'OMS pour établir la limite maximale dans l'eau de boisson à 1 µg/L, la prise de l'une ou l'autre option revêt une conséquence importante en terme d'exposition, surtout en considérant les forts consommateurs de poissons. Un autre paramètre est à souligner en terme de contamination et du risque lié, celui de la saisonnalité et du caractère aiguë de l'intoxication. La présence de cyanotoxines dans les coquillages, les crustacés et les poissons étant aléatoire durant l'année et très liée aux conditions climatologiques, la connaissance précise des conditions d'exposition de la population française ne peut se faire qu'à travers un suivi de la contamination des milieux aquatiques. En l'état actuel des connaissances et des moyens analytiques, une telle surveillance ne peut s'envisager que pour la microcystine.

Enfin, si une réponse partielle peut être donnée pour le problème des microcystines, il n'en demeure pas moins que la présence d'autres toxines qui pourraient s'accumuler dans ces organismes n'est que peu renseignée. L'identification de la présence de cylindrospermopsine

dans certains réservoirs bretons peut ainsi soulever le questionnement de la bioaccumulation de cette toxine et il en est de même pour les anatoxines impliquées dans la mort de plusieurs chiens en France (Gugger *et al.*, 2005 ; Cadel-Six *et al.*, 2007).

En conséquence, l'Afssa recommande :

- que des équipes nationales portent des projets de recherche sur la biodisponibilité des microcystines liées et sur la contamination par les cyanotoxines des poissons et autres animaux aquatiques pouvant être consommés par l'homme, en France (y compris les poissons et autres animaux aquatiques importés) ;
- qu'une surveillance de la contamination des milieux aquatiques par les cyanobactéries soit mise en place, complétée par un programme de suivi de la contamination en microcystine dans les espèces aquatiques (poissons, crustacés et mollusques) dès que la surveillance met en évidence la présence de cyanobactéries susceptibles de produire cette cyanotoxine.

10. BIBLIOGRAPHIE

- Cadel-Six S., Peyraud-Thomas C., Briant L., Tandeau de Marsac N., Rippka R., Méjean A. (2007). Different Genotypes of Anatoxin-Producing Cyanobacteria Coexist in the Tarn River, France. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7605-7614.
- Carbis C.R., Rawlin G.T., Grant P., Mitchell G.F., Anderson J.W. (1997). A study of feral carp, *Cyprinus carpio* L, exposed to *Microcystis aeruginosa* at Lake Mokoan, Australia, and possible implications for fish health. *J. Fish Dis.* 20: 81-91.
- Cazenave J., Wunderlin D.A., Angeles Bistoni M., Amé M.V., Krause E., Pflugmacher S., Wiegand C. (2005) Uptake, tissue distribution and accumulation of microcystin-RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis*. A field and laboratory study. *Aquatic Toxicology*, 75 : 178-190.
- Chen J., Xie P. (2005a). Seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins in various organs of four freshwater bivalves from the large eutrophic lake Taihu of subtropical China and the risk to human consumption. *Environ Toxicol.* 20(6):572-84.
- Chen J., Xie P. (2005b). Tissue distributions and seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins-LR and -RR in two freshwater shrimps, *Palaemon modestus* and *Macrobrachium nipponensis*, from a large shallow, eutrophic lake of the subtropical China. *Toxicon*, 45 : 615-625
- Chen J., Xie P., Zhang D., Ke Z., Yang H. (2006a) *In situ* studies on the bioaccumulation of microcystins in the phytoplanktivorous silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) stocked in Lake Taihu with dense toxic *Microcystis* blooms. *Aquaculture*, 261 : 1026-1038
- Chen J., Xie P., Zhang D., Lei H. (2006b). *In situ* studies on the distribution patterns and dynamics of microcystins in a biomaniplulation fish-bighead carp (*Aristichthys nobilis*). *Environmental Pollution*, 147: 150-157
- Cole G.I. et Wyne M.J. (1974). Endocystis of *Microcystis aeruginosa* by *Ochromonas danica*. *J. Phycol.* 10, 387- 410.
- Demott W. (1999). Foraging strategies and growth inhibition in five daphnids feeding on mixtures of a toxic cyanobacterium and a green alga. *Fresh. Biol.* 42, 263-274.
- Dionisio Pires L.M., Karlsson K.M., Meriluoto J.A.O., Kardinaal E., Visser P.M., Siewertsen K., Van Donk E., Ibelings B.W. (2004). Assimilation and depuration of microcystin-LR by the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Aquatic Toxicology*, 69, 385-396.
- Engström-Öst J., Lehtiniemi M., Green S., Kozłowski-Suzuki B., Viitasalo M. (2002). Does cyanobacterial toxins accumulate in mysid shrimps and fish via copepods? *J Exp Mar Biol Ecol* 276, 95-107.
- Ferrao-Filho A.S., Kozłowski-Suzuki B., Azevedo S.M.F.O. (2002). Accumulation of microcystins by a tropical zooplankton community. *Aquatic Toxicol* 59, 201-208.
- Fullton R.S. and Pearl H.W. (1987). Toxic and inhibitory effects of the blue-green algae *Microcystis aeruginosa* on herbivorous zooplankton. *J. Plankt. Res.* 9, 837-855.
- Gugger M., Lenoir S., Berger C., Ledreux A., Druart J.C., Humbert J.F., Guette C. & Bernard C. (2005). First record in France of the benthic cyanobacterium *Phormidium favosum* producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis. *Toxicon* 45, 919-928.
- Gulati R.D., Ejsmont-Karabin J., Postema G. (1993). Feeding in *Euchlanis dialata lucksiana* Hauer on filamentous cyanobacteria and a prochlorophyte. *Hydrobiologia.* 255/256, 269-274.
- Ibelings B.W. and Chorus I. (2007). Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater "seafood" and its consequences for public health: A review. *Environ Pollut.* 150(1):177-192.
- Kankaanpää H., Vuorinen P. J., Sipia V., Keinänen M. (2002). Acute effects and bioaccumulation of nodularin in sea trout (*Salmo trutta* m. *trutta* L.) exposed orally to *Nodularia spumigena* under laboratory conditions. *Aquatic Toxicology* 61, 155-168.

- Kankaanpaa H., Leinio S., Olin M., Sjoval O., Meriluoto J., Lehtonen K.K. (2007) Accumulation and depuration of cyanobacterial toxin nodularin and biomarker responses in the mussel *Mytilus edulis*. Chemosphere, 68 : 1210-1217
- Karjalainen M., Reinikainen M., Spoof L., Meriluoto J.A.O., Sivonen K., Viitasalo M. (2005) Trophic transfer of cyanobacterial toxins from zooplankton to planktivores: Consequences for pike larvae and mysid shrimps. Env. Toxicol. 20, 354-362
- Karjalainen M., Kozlowsky-Suzuki B., Lehtiniemi M., Engström-Öst J., Kankaanpaa H., Viitasalo M. (2006). Nodularin accumulation during cyanobacterial blooms and experimental depuration in zooplankton. Marine Biol. 148, 683-691
- Kotak B.G., Zurawell R.W., Prepas E.E., Holmes C.F.B., 1996. Microcystin-LR concentration in aquatic food web compartments from lakes of varying trophic status. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 53, 1974-1985.
- Kurmayer R. et Jüttner F., 1999. Strategies for the co-existence of zooplankton with the toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* in Lake Zurich. J. Plankt. Res. 31, 659-683.
- Lance E., Brient L., Bormans M., Gérard C. (2006) Interactions between cyanobacteria and gastropods. I. Ingestion of toxic *Planktothrix agardhii* by *Lymnea stagnalis* and the kinetics of microcystin bioaccumulation and detoxification. Aquatic Toxicology, 79 : 140-148
- Laurén-Määttä C., Hietala J., Reinikainen M., Walls M. (1995). Do *Microcystis aeruginosa* toxins accumulate in the food web, a laboratory study. Hydrobiologia 304, 23-27
- Laurent L., Kerbrat A.S., Darius H.T., Girard E., Golubic S., Benoit E., Sauviat M.P., Chinain M., Molgo J., Pauillac S. (2008) Are cyanobacteria involved in Ciguatera Fish Poisoning outbreaks in New-Caledonia ? Acceptée dans Harmful Algae.
- Leblanc JC (Coordinateur). CALIPSO : Etude des Consommation Alimentaire de produits de la mer et Imprégnation aux éléments traces, PolluantS et Oméga 3, AFSSA-DGAI-INRA, août 2006.
- Liras V., Lindberg M., Nyström P., Annadotter H., Lawton L.A., Graf B. (1998) Can ingested cyanobacteria be harmful to the signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*)? Freshwater Biology 39, 233-242
- Magalhães V.F., Marinho M.M., Domingos P., Oliveira A.C., Costa S.M., Azevedo L.O., Azevedo S.M. (2003). Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). Toxicon. 42, 289-295
- Mohamed Z.A. (2001). Accumulation of cyanobacterial hepatotoxins by *Daphnia* in some Egyptian irrigation canals. Ecotox Env Safety 50, 4-8
- Mohamed Z.A. and Hussein A.A. (2006). Depuration of microcystins in tilapia fish exposed to natural populations of toxic cyanobacteria: a laboratory study. Ecotoxicol Environ Saf. 63(3):424-9.
- Oberhaus L., Gélinas M., Pinel-Alloul B., Ghadouani A., Humbert J.F. (2007). Grazing of two toxic *Planktothrix* species by *Daphnia pulex*: potential for bloom control and transfer of microcystins. J. Plankton Res. 29, 827-838.
- Pereira P., Dias E., Franca S., Pereira E., Carolino M., Vasconcelos V. (2004). Accumulation and depuration of cyanobacterial paralytic shellfish toxins by the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. Aquatic Toxicology 68, 339-350.
- Preussel K., Stüken A., Wiedner C., Chorus I., Fastner J. (2005). First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. Toxicon. 47(2):156-62.
- Rothhaupt K.O.(1991). The influence of toxic and filamentous blue-green algae on feeding and population growth of the rotifer *Brachionus rubens*. Int. Rev. Ges. Hydrobiol. 76, 67-72.
- Saker M.L., Metcalf J.S., Codd G.A., Vasconcelos V.M. (2004). Accumulation and depuration of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. Toxicon 43(2):185-94.
- Sipiä V.O., Neffling M.R., Metcalf J.S., Nybom S.M.K., Meriluoto J.A.O., Codd G.A. (2008). Nodularin in feathers and liver of eiders (*Somateria mollissima*) caught from the western Gulf of Finland in June-September 2005. Harmful algae 7, 99-105.
- Smith J.L., Haney J.F. (2006). Foodweb transfer, accumulation, and depuration of microcystins, a cyanobacterial toxin, in pumpkinseed sunfish (*Lepomis gibbosus*). Toxicon 48(5):580-589.
- Soares R.M., Magalhães V.F., Azevedo S.M. (2004). Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions. Aquat Toxicol. 70, 1-10.
- Strogloudi E., Giannakourou A., Legrand C., Ruehl A., Granéli (2006). Estimating the accumulation and transfer of *Nodularia Spumigena* toxins by the blue mussel *Mytilus edulis* : an appraisal from culture and mesocosm experiments. Toxicon, 48, 359-372.
- Thostrup L., Christoffersen K. (1999). Accumulation of microcystin in *Daphnia magna* feeding on toxic *Microcystis*. Arch. Hydrobiol. 145, 447-467.
- Van Buynder, P.G., Oughtred, T., Kirby, B., Phillips, S., Eaglesham, G., Thomas, K. and Burch, M., (2001). Nodularin uptake by seafood during a cyanobacterial bloom. Environ. Toxicol. 16, pp. 468-471.
- Vasconcelos V., Oliveira S., Teles F.O. (2001) Impact of a toxic and a non-toxic strain of *Microcystis aeruginosa* on the crayfish *Procambarus clarkii*. Toxicon 39, 1461-1470.
- Volatier J.L. (2000). Enquête Individuelle et Nationale sur les Consommations Alimentaires. Editions TEC et DOC, 158p.

- Watanabe M.M., Kaya K., Takamura N., 1992. Fate of the toxic cyclic heptapeptides, the microcystin, from blooms of *Microcystis* (cyanobacteria) in a hypertrophic lake. J. Phycol. 28, 761-767.
- White S.H., Duivenvoorden L.J., Fabbro L.D., Eaglesham G.K. (2006). Influence of intracellular toxin concentrations on cylindrospermopsin bioaccumulation in a freshwater gastropod (*Melanoides tuberculata*). *Toxicon*. 47(5):497-509.
- Xie L., Xie P., Guo L., Li L., Miyabara Y., Park H.D. (2005). Organ distribution and bioaccumulation of microcystins in freshwater fish at different trophic levels from the eutrophic Lake Chaohu, China. *Environ Toxicol*. 20(3):293-300.
- Xie L., Xie P., Ozawa K., Honma T., Yokoyama A., Park H.D. (2004). Dynamics of microcystins-LR and -RR in the phytoplanktivorous silver carp in a sub-chronic toxicity experiment. *Environ Pollut*. 127(3):431-439.
- Xie L., Yokoyama A., Nakamura K., Park H. (2007). Accumulation of microcystins in various organs of the freshwater snail *Sinotaia histrica* and three fishes in a temperate lake, the eutrophic Lake Suwa, Japan. *Toxicon* 49(5):646-652.
- Yokoyama A. and Park H.D. (2003). Depuration kinetics and persistence of the cyanobacterial toxin microcystin-LR in the freshwater bivalve *Unio douglasiae*. *Environ Toxicol*. 18, 61-67.
- Yuan M., Carmichael W.W., Hilborn E.D. (2006) Microcystin analysis in human sera and liver from human fatalities in Caruaru, Brazil 1996. *Toxicon*, 48 : 627-640
- Zhang H.J., Zhang J.Y., Hong Y., Chen Y.X. (2007a). Evaluation of organ distribution of microcystins in the freshwater phytoplanktivorous fish *Hypophthalmichthys molitrix*. *J Zhejiang Univ Sci B*. 8(2):116-120.
- Zhang H.G., Xie P., Liu Y., Chen J., Liang G. (2007b). Bioaccumulation of the hepatic microcystins in various organs of a freshwater snail from a subtropical chinese lake, Taihu lake, with dense toxic *Microcystis* blooms. *Environ. Toxicol. Chem*. 26, 171-176.
- Zurawell R.W., Holmes C.F., Prepas E.E. (2006). Elimination of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin from the freshwater pulmonate snail *Lymnaea stagnalis jugularis* (say). *J Toxicol Environ Health A*. 69, 303-318
- Zurawell R.W., Goldberg J.I., Holmes C.F., Prepas E.E.(2007). Tissue distribution and oral dose effects of microcystin in the freshwater pulmonate snail *Lymnaea stagnalis jugularis* (Say). *J. Toxicol. Environ. Health A*. 70, 620-626.

11. MOTS CLÉS.

Cyanobactéries, cyanotoxines, contamination, espèces aquatiques.

Pascale BRIAND