

anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Connaître, évaluer, protéger

Valeurs toxicologiques de référence

La saxitoxine

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective

Mars 2020 - Édition scientifique



anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



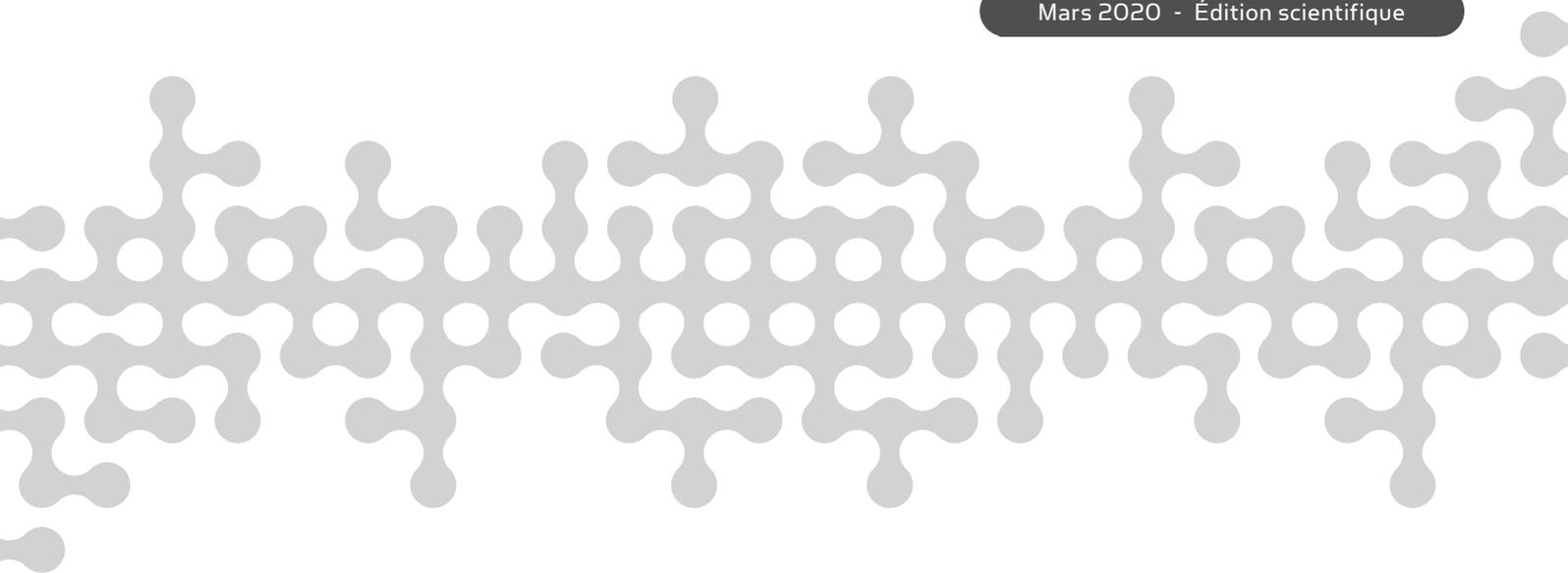
Connaître. évaluer. protéger

Valeurs toxicologiques de référence

La saxitoxine

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective

Mars 2020 - Édition scientifique



Maisons-Alfort, le 16 mars 2020

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

relatif à la proposition de VTR aiguë par voie orale pour la saxitoxine
(CAS n° 35523-89-8)

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part à l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont publiés sur son site internet.

L'Anses a été saisie le 19 juillet 2016 par la Direction générale de la santé (DGS) afin d'actualiser ses travaux relatifs à l'évaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries et de leurs toxines dans les eaux destinées à la consommation humaine (EDCH), à la baignade et autres activités récréatives.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Dans le cadre de l'instruction de la saisine portant sur l'évaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries et de leurs toxines dans les EDCH, à la baignade et autres activités récréatives il est apparu nécessaire d'actualiser le corpus documentaire relatif à la toxicité des cyanotoxines.

Trois toxines ont été identifiées par les experts comme nécessitant un travail spécifique. Compte tenu de sa mission pérenne en matière d'élaboration de valeurs toxicologiques de référence (VTR), et afin de répondre aux termes de cette saisine, l'Anses a décidé de procéder à l'élaboration d'une VTR pour ces trois toxines : la saxitoxine (CAS n°35523-89-8) [désignée STX dans la suite de cet avis], la microcystine-LR (CAS n°101043-37-2) et la cylindrospermopsine (CAS n°143545-90-8). Le résultat de ce travail est publié dans trois avis distincts de l'Agence, un pour chaque toxine.

Le présent avis a donc pour objet de proposer une VTR aiguë par voie orale pour la STX. La VTR sera notamment utilisée au cours de l'expertise de l'Agence portant plus globalement sur les risques sanitaires liés à la présence de cyanobactéries (saisine 2016-SA-0165).

Une VTR est un indice toxicologique qui permet de qualifier ou de quantifier un risque pour la santé humaine. Elle établit le lien entre une exposition à une substance toxique et l'occurrence d'un effet sanitaire indésirable. Les VTR sont spécifiques d'une durée d'exposition (aiguë, subchronique ou chronique) et d'une voie d'exposition (orale ou respiratoire). La construction des VTR diffère en fonction des connaissances ou des hypothèses formulées sur les mécanismes d'action des substances. Actuellement, l'hypothèse par défaut est de considérer une relation monotone entre l'exposition, ou la dose, et l'effet, ou la réponse. En l'état actuel des connaissances et par défaut, on considère généralement que, pour les effets non cancérogènes, la toxicité ne s'exprime qu'au-delà d'un seuil de dose (Anses, 2017).

En pratique, la construction de la VTR comprend les étapes suivantes :

- recenser et analyser les données de toxicité disponibles, sur la base d'études épidémiologiques et/ou expérimentales,
- identifier le ou les organes cibles et l'effet critique ;
- identifier l'hypothèse de construction, à seuil ou sans seuil de dose, en fonction du mode d'action de la substance,
- choisir une étude clé de bonne qualité scientifique permettant généralement d'établir une relation dose – réponse ;
- définir une dose critique chez l'Homme ou l'animal à partir de cette étude, éventuellement dans le cas d'une dose critique obtenue chez l'animal, ajuster cette dose à l'Homme ;
- pour une VTR à seuil, appliquer des facteurs d'incertitude à cette dose critique de manière à dériver une VTR applicable à l'ensemble de la population concernée ;
- pour une VTR sans seuil, réaliser une extrapolation linéaire à l'origine afin de déterminer un excès de risque unitaire.

L'élaboration des VTR suit une approche structurée et exigeante qui implique des évaluations collectives par des groupes de spécialistes.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

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

L'expertise collective a été réalisée par le comité d'experts spécialisé (CES) « Valeurs sanitaires de référence » (VSR). Les travaux ont été présentés au CES tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques. Deux rapporteurs ont été nommés pour évaluer les études toxicologiques éligibles à la construction d'une VTR aiguë par voie orale pour la STX. Les travaux ont été adoptés par le CES VSR réuni le 17 octobre 2019.

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

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES

■ Synthèse des données toxicologiques

La synthèse des données toxicologiques a été rédigée sur la base du rapport de l'Agence européenne de sécurité des aliments (« European Food Safety Authority » ou EFSA) publié en 2009 (EFSA, 2009), complétée par une recherche bibliographique réalisée entre le 26 novembre et le 17 décembre 2018 dont les critères des requêtes bibliographiques figurent en annexe 2 du rapport associé au présent avis.

- Toxicocinétique

Après injection intraveineuse (i.v) unique chez le rat, la STX se distribue rapidement dans la circulation sanguine puis dans le reste de l'organisme (Garcia *et al.*, 2004 ; Andrinolo *et al.*, 1999). Lors d'une administration par voie orale, la STX traverse la barrière intestinale et accède à la circulation sanguine générale malgré l'effet de premier passage hépatique, ce qui lui donne accès au système nerveux périphérique (SNP), lequel est sa cible principale (Andrinolo *et al.*, 2002 ; Torres *et al.*, 2007).

Chez l'Homme, la STX et ses variants, comme par exemple la néosaxitoxine (néoSTX) et les gonyautoxines (GTX), sont également distribués dans de nombreux organes, tissus et fluides biologiques : cerveau, bile, liquide céphalo-rachidien, foie, rate, cœur, thyroïde, glandes surrénales, reins, pancréas et poumons et ce quelle que soit la voie d'exposition considérée.

En outre, des résultats d'études montrent que la STX et ses variants initialement présents dans le contenu gastrique subissent des transformations métaboliques pendant les 3 à 4 heures qui suivent une intoxication humaine (Garcia *et al.*, 2004 ; Llewellyn *et al.*, 2002).

Les glucuronides qui résultent des réactions d'oxydation (phase I) et de glucuronidation (phase II), sont souvent le produit final de cette métabolisation. Ils sont éliminés majoritairement *via* les urines ou minoritairement par la bile (Garcia *et al.*, 2010 ; Testai *et al.*, 2016). L'efficacité de l'excrétion des STX dépend également de leur affinité pour les différents sous-types de canaux sodium (Na^+) voltage-dépendants, appelés Na_v .

D'autres études corroborent ces résultats, notamment celles qui montrent que les variants gonyautoxines 2 et 3 (GTX-2 et -3) sont principalement excrétés par filtration glomérulaire chez l'Homme et l'animal (Andrinolo *et al.*, 1999 ; Andrinolo *et al.*, 2002). Récemment, un cas de « paralytic shellfish poisoning » (PSP) en Alaska a attesté de l'élimination par voie rénale de la STX ainsi que d'autres « paralytic shellfish toxins » (PST) lors d'une analyse de l'urine de la patiente par chromatographie liquide haute performance (HPLC) (Coleman *et al.*, 2018).

Selon les études, les espèces considérées et la matrice biologique retenue, la demi-vie d'élimination de la STX est comprise entre 1h30 et 10h, ce qui est en accord avec la courte durée des symptômes observés lors d'intoxication (Kao, 1993 ; Andrinolo *et al.*, 1999 ; Gessner *et al.*, 1997).

S'agissant d'une potentielle élimination fécale, les études expérimentales montrent que cette voie semble être largement minoritaire voire inexistante (Hines *et al.*, 1993 ; Stafford et Hines, 1995 ; Andrinolo *et al.*, 1999).

- Toxicité aiguë et subaiguë

Les cas d'intoxications humaines se traduisent majoritairement par des signes neurologiques et musculaires. Plus précisément, les signes précoces d'intoxication tels que des paresthésies de type picotements, fourmillements ou engourdissement péribuccal et des extrémités, qui apparaissent

rapidement, peuvent être suivis de parésies et de paralysies musculaires, engageant le pronostic vital en cas d'atteinte des muscles respiratoires (Arnich et Thébault, 2018).

D'autres symptômes tels que des céphalées, une hypersalivation, une soif intense, des sueurs, des vomissements, une diarrhée et des douleurs digestives peuvent également avoir lieu lors d'une intoxication (Rapala *et al.*, 2005). Au-delà de 12 heures, quand les troubles respiratoires n'ont pas entraîné le décès de la personne intoxiquée, l'évolution est favorable en quelques heures à quelques jours. Il n'existe à ce jour aucun traitement spécifique : la prise en charge est donc symptomatique, pour les troubles qui le nécessitent.

La méta-analyse la plus récente réalisée à partir de cas d'intoxications humaines, établit une dose minimale critique de $0,37 \mu\text{g} \text{ éq-STX.kg}^{-1} \text{ p.c}$ correspondant à une probabilité supérieure à 10% de présenter les symptômes (Arnich et Thébault, 2018). Cette dose critique retenue par les auteures de la méta-analyse représente une dose environ quatre fois inférieure au LOAEL de $1,5 \mu\text{g} \text{ éq-STX.kg}^{-1} \text{ p.c}$ établi par l'EFSA, basé sur un ensemble de symptômes qualifiés de « légers » (EFSA, 2009).

Les études expérimentales disponibles sont majoritairement réalisées en exposant les animaux *via* plusieurs voies d'exposition différentes : eau de boisson, gavage, voie i.v ou intrapéritonéale (i.p). Ces études de toxicité aiguë décrivent essentiellement des doses létales 50% (DL_{50}) sans que les auteurs n'aient tenté de caractériser une relation dose-effet, car le mécanisme de toxicité de la STX et de ses dérivés rend l'établissement d'une relation dose-effet extrêmement difficile.

Le CES a retenu trois études expérimentales réalisées chez des souris, comme les plus informatives sur la toxicité de la STX et de ses variants chez l'animal : Munday *et al.* (2013) ; Selwood *et al.* (2017) et Finch *et al.* (2018), possédant le même protocole d'étude et ayant été réalisées par les mêmes équipes de chercheurs. Les résultats de ces trois études se confortent car sont sensiblement similaires.

L'étude de Munday *et al.* (2013) met en évidence que les toxicités aiguës de tous les variants de la STX par gavage sont significativement plus faibles que celles par injection i.p, et que les toxicités aiguës par l'alimentation sont plus faibles que celles par gavage. D'autre part, la néoSTX est rapportée comme significativement plus toxique que la STX par gavage et par l'alimentation. Le CES souligne que les facteurs d'équivalence de toxicité, communément appelés TEF (« Toxicity Equivalence Factors ») en anglais, relatifs aux variants de la STX, présentent une grande disparité de valeurs dans la littérature scientifique. L'étude de Selwood *et al.* (2017) suggère d'ailleurs de réviser les valeurs définies par l'EFSA en 2009.

Les indicateurs les plus sensibles des effets sublétaux mentionnés dans l'étude de Munday *et al.* (2013) sont une respiration abdominale, la léthargie et une diminution du comportement exploratoire des souris. L'étude signale qu'une diminution de la force de préhension n'est observée qu'à des doses légèrement inférieures à la DL_{50} .

Les études expérimentales confirment donc les symptômes observés lors d'intoxications humaines aiguës. Cette cohérence est liée au mécanisme d'action de la STX et de ses variants, identique quelle que soit l'espèce exposée à la toxine.

- Irritation

Plusieurs cas d'intoxication d'enfants âgés de 2 à 10 ans, lors de la contamination de lacs finlandais par des efflorescences de diverses espèces de cyanobactéries productrices de STX, se sont traduits par une irritation cutanée et oculaire. Ces effets toxiques, associés à des signes systémiques tels que des douleurs abdominales et de la fièvre, sont imputés par les auteurs à la STX et ses variants (Rapala *et al.*, 2005).

La toxicité cutanée engendrée par la contamination d'eaux récréatives par des cyanobactéries est attribuée aux lipopolysaccharides (LPS), constituants de la paroi cellulaire de l'ensemble des cyanobactéries. Les LPS, retrouvés en effet chez toutes les bactéries Gram négatives, peuvent provoquer des réactions d'irritation et allergiques dans les tissus humains et animaux (Pilotto *et al.*, 2004). D'autres espèces de cyanobactéries, non productrices de STX, peuvent donc également mener à une irritation cutanée.

- Sensibilisation

D'une manière générale, la sensibilité des individus aux cyanobactéries dans les eaux de baignade est très variable, car il peut s'agir aussi bien de réactions allergiques aux cyanobactéries que de réactions directement induites par les toxines. Les pigments cyanobactériens peuvent par exemple être à l'origine de réactions allergiques (Cohen et Reif, 1953).

Les cyanobactéries ont en effet des caractéristiques communes avec les pneumallergènes courants en suspension dans l'air et des études ont montré des réponses allergiques aux cyanobactéries chez des patients souffrant de rhinite et/ou d'asthme allergique. Un cas détaillé récent rapporte une réaction allergique se manifestant par un œdème facial grave avec œdème périorbitaire et une éruption cutanée prurigineuse érythémateuse sur les bras et les mains après une baignade dans un lac. L'analyse d'un échantillon du sérum de la patiente a montré une augmentation des immunoglobulines E (IgE) spécifiques à l'extrait de cyanobactéries, en excluant d'autres causes sous-jacentes (Geh *et al.*, 2016).

- Toxicité subchronique et chronique

Les études expérimentales de toxicité subchronique/chronique mettent majoritairement en évidence la neurotoxicité induite par la STX et ses variants. Cette dernière se manifeste par :

- des altérations de l'activité antioxydante totale (« Total Antioxidant Capacity » ou ACAP) et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO, soit « Reactive Oxygen Species » ou ROS en anglais) dans le cerveau, notamment l'hippocampe, et dans le foie, associée à une diminution des défenses antioxydantes (Ramos *et al.*, 2014) ;
- une diminution de l'activité de la glutamate cystéine ligase (GCL) ainsi qu'une augmentation de la concentration de glutathion et de la glutathion-S-transférase (GST) dans le cerveau (Ivanova *et al.*, 2011) ;
- une diminution des performances des mémoires aversives et spatiales, mise en évidence par les tests de l'évitement intérieur (« Inhibitory Avoidance » ou IA) et du labyrinthe aquatique de Morris (« Morris water maze » ou MWM) ;
- une augmentation des niveaux d'acides aminés neurotransmetteurs (aspartate, glutamate, GABA) dans le cerveau (Cianca *et al.*, 2009) ;
- une altération aiguë de la production de dopamine (DA) et de son métabolite, l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique (DOPAC) (Cianca *et al.*, 2011) ;

La STX perturbe donc l'homéostasie de certaines voies de neurotransmission centrales. D'autre part, étant donné que l'excitabilité neuronale joue un rôle important dans le développement normal du SNC, une exposition prolongée aux PST peut affecter la neurogenèse (Brackenbury *et al.*, 2010).

En outre, une diminution transitoire du poids corporel et de la consommation de nourriture après administration répétée (12 semaines), ainsi qu'une cholestase transitoire en fin de période de traitement ont été observées chez le rat Sprague-Dawley lors d'une exposition par voie sous-cutanée de 6 µg.kg⁻¹ de néoSTX (Zepeda *et al.*, 2014).

- Reprotoxicité et effets sur le développement

Aucune étude sur la toxicité potentielle sur la reproduction et le développement chez l'Homme ou l'animal n'est disponible à ce jour pour la SXT et ses variants. Cependant, deux études ont évalué l'impact de la STX sur le développement du poisson-zèbre : l'exposition de larves de poissons-zèbres à la STX ($229 \mu\text{g éq-STX.L}^{-1}$) pendant 7 jours a induit une diminution des fonctions sensorimotrices dès 48 heures et une paralysie après 4 jours. À une dose 2 fois supérieure ($481 \mu\text{g éq-STX.L}^{-1}$), la toxine a entraîné un œdème au niveau de plusieurs organes (œil, péricarde, sac vitellin). Enfin une paralysie des larves, dont l'intensité dépend du stade de développement, a été constatée. L'étude note que ces effets morphologiques et sensorimoteurs sublétaux étaient réversibles si ces larves étaient ensuite placées dans une eau exempte de toute toxine. Les poissons-zèbres exposés transitoirement à la STX au cours du développement larvaire (2 à 4 jours après fertilisation) avaient une croissance et une survie réduites (Lefebvre *et al.*, 2004). Cependant, les concentrations utilisées dans ces études sont plus élevées que celles auxquelles une personne est susceptible d'être exposée sur une longue période (Oberemm *et al.*, 1999 ; Lefebvre *et al.*, 2004). Il est en conséquence difficile d'extrapoler ces données expérimentales à l'Homme.

- Génotoxicité

Il n'existe que très peu d'études sur la génotoxicité potentielle de la STX et de ses variants. Une étude récente, celle de Melegari *et al.* (2015), n'a démontré aucun changement significatif dans la fréquence des cellules binucléées présentant des micronoyaux (MN) dans les cellules N2A et Vero exposées à la STX, indiquant l'absence de génotoxicité dans ces conditions d'essai.

À l'inverse, des effets génotoxiques ont été mis en évidence sur le poisson dulcicole *Hoplias malabaricus* (Da Silva *et al.*, 2011). L'étude de Da Silva *et al.* (2014), a confirmé ces résultats en exposant des cellules neuronales de *H. malabaricus* à une concentration de $3 \mu\text{g.L}^{-1}$ d'éq-STX. Lors de cette exposition, le test des comètes a montré une augmentation du nombre de dommages à l'ADN (Da Silva *et al.*, 2014).

- Cancérogénicité

La STX n'a pas été étudiée quant à son caractère cancérogène par le Centre International de recherche sur le cancer (CIRC). Ceci est dû, selon le CES, à un profond manque de données dans la littérature scientifique, qui ne permet pas de déterminer le potentiel cancérogène de la STX.

- Populations à risque

D'après une étude de cas relative à une épidémie d'intoxication par des mollusques (*Amphichaena kindermani*) entre juillet et août 1987, sur la côte pacifique du Guatemala, les enfants semblent être la population la plus sensible. Sur les 187 personnes intoxiquées dans cette étude et présentant des symptômes, les enfants de moins de 6 ans avaient un taux de mortalité plus élevé (50%) que les personnes de plus de 18 ans (7%) (Rodrigue *et al.*, 1990).

■ VTR aiguë

- Choix de l'effet critique

Comme vu précédemment, les premiers effets qui apparaissent aux plus faibles doses chez l'Homme après une intoxication par la STX ou ses variants aux plus faibles doses sont des paresthésies péri-buccales, étourdissements, céphalées, nausées, vomissements ainsi que des vertiges. Ces symptômes sont suivis d'asthénie, de faiblesse musculaire et de discours incohérents. Lors d'une intoxication, ces symptômes évoluent rapidement vers des paralysies musculaires, des difficultés respiratoires sévères, qui peuvent conduire jusqu'au décès (Arnich et Thébault, 2018).

La liaison aux canaux Na_v et le blocage de leur conductance sont considérés comme le principal mécanisme moléculaire de la neurotoxicité de la STX et de ses variants (EFSA, 2009).

Dans les études expérimentales, les intoxications des animaux sont également caractérisées par des symptômes de gravité croissante. L'évaluation quantitative à des doses sublétales de la diminution de la force de préhension (« grip strength ») dans l'étude de Munday et al. (2013), a permis de compléter les observations qualitatives des symptômes chez les animaux après l'exposition à la STX. Toutefois, le choix d'un effet critique est délicat car les signes de dysfonctions neurologiques bénins peuvent évoluer de manière rapide vers des troubles graves pouvant mener au décès.

Du fait des incertitudes relevées dans les études épidémiologiques relatives aux estimations des expositions des personnes intoxiquées, le CES propose de ne pas retenir les paresthésies observées chez l'Homme dans certains cas d'intoxications non bénignes, comme effet critique.

Le CES propose de retenir comme effet critique la dysfonction des muscles squelettiques engendrée par le blocage des canaux Na_v , observée dans les études expérimentales. Il attire en outre l'attention sur la difficulté d'établir une relation dose-effet quant à la toxicité de la STX et de ses variants, du fait de leur mécanisme de toxicité.

- Analyse des VTR aiguës existantes

Compte tenu des limites des études épidémiologiques, liées notamment à la difficulté de caractériser précisément les expositions des individus intoxiqués, il est décidé par le CES de ne pas retenir les études épidémiologiques disponibles pour l'élaboration d'une VTR ni l'« acute reference dose » de $0,5 \mu\text{g éq-STX.kg p.c}^{-1}.\text{j}^{-1}$ établie par l'EFSA en 2009.

Ainsi, le CES propose de construire une nouvelle VTR aiguë par voie orale basée sur une étude expérimentale.

- Construction d'une VTR aiguë
 - Choix de l'étude-clé

Les études épidémiologiques présentant divers biais, le CES a proposé de déterminer la VTR sur la base de l'une des études expérimentales disponibles. Trois études expérimentales ont été sélectionnées par le CES car ces dernières constituent les études les plus récentes et adaptées à l'élaboration d'une VTR. Ce sont les études de Munday *et al.* (2013), Selwood *et al.* (2017) et Finch *et al.* (2018), mentionnées précédemment.

Peu de différences existent entre ces études, réalisées par la même équipe de chercheurs. Néanmoins, **l'étude de Munday *et al.* (2013) a été choisie comme étude-clé** car elle est la seule à compléter l'étude des effets toxiques de la STX par le test de préhension, qui permet d'objectiver les résultats de l'observation visuelle de 14 jours effectuée dans les trois études.

En outre, l'étude de Selwood *et al.* (2017), ayant pour objectif de déterminer la toxicité aiguë des variants de la STX en vue de les comparer avec celle de la STX, reprend le NOAEL de l'étude de Munday *et al.* (2013) de 544 nmol.kg⁻¹ par gavage dans son tableau de résultats. Ceci incite à utiliser directement l'étude source ayant déterminé ce NOAEL.

- Choix de la dose critique

Le CES souligne la difficulté de déterminer une dose critique du fait de l'absence de relation dose-effet claire dans l'étude-clé retenue, et de ce fait la difficulté de modéliser une « Benchmark Dose » (BMD). Malgré l'absence de relation dose-effet observable dans cette étude et le faible niveau de détails des symptômes survenant avant la mort, le NOAEL de 544 nmol.kg⁻¹ peut être considéré comme un point de départ pour l'élaboration d'une VTR. Toutefois, le CES insiste sur l'intervalle de dose très étroit entre le NOAEL observé et les DL₅₀ décrites dans l'étude. Cet intervalle étroit, amène le CES à mettre en garde sur la gravité des intoxications possibles si la VTR élaborée est dépassée.

Le CES souligne que pour pallier l'absence d'information sur l'intervalle entre le NOAEL et le LOAEL dans l'étude-clé retenue, il serait judicieux de réaliser une étude en multipliant les doses d'exposition sur un intervalle de doses rapprochées, afin de pouvoir mieux caractériser une relation effet-dose. Une étude robuste, réalisée *via* une voie d'administration représentative telle que l'exposition par eau de boisson, pourrait permettre de modéliser la pente correspondant à la relation dose-effet et d'en apprécier l'intensité. Au vu de la difficulté à quantifier les effets observés, ladite étude devrait prévoir de réaliser les tests de neurotoxicité les plus appropriés.

Le CES a donc considéré le NOAEL décrit dans l'étude Munday *et al.* (2013) comme le seuil *en deça* duquel il n'est pas attendu de blocage suffisant des canaux Na_v à même d'induire une paralysie musculaire observable chez les animaux exposés.

$$\text{NOAEL} = 544 \text{ nmol.kg}^{-1} = 163 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$$

- Ajustement allométrique

Pour réduire la valeur de l'incertitude sur la variabilité inter-espèce, un ajustement allométrique a été réalisé. Une dose équivalente humaine (« Human Equivalent Dose » soit HED) est calculée à l'aide de l'équation suivante¹ :

$$\text{Dose équivalente Homme} = \text{Dose animal} \times \left(\frac{\text{Poids animal}}{\text{Poids homme}} \right)^{1/4}$$

Un poids des souris de 22 g a été utilisé pour le calcul, basé sur l'intervalle des poids de souris renseigné dans l'étude (18 – 22g) et afin de davantage concorder avec la préconisation de l'US EPA (US EPA, 2006) de 25g. Pour l'Homme, le poids utilisé pour le calcul est de 70 kg.

$$\text{NOAEL}_{\text{HED}} = 163 \times (0,022 / 70)^{1/4} = 22 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ p.c}$$

¹ Cette équation est issue des recommandations de l'US EPA (US EPA, 2006).

- Choix des facteurs d'incertitude

Le calcul de la VTR à partir de l'étude de Munday *et al.* (2013) a été effectué à l'aide des facteurs d'incertitude suivants (Anses, 2017) :

- Variabilité inter-espèces (UF_A) : 2,5. L'ajustement allométrique réalisé a permis de calculer une dose équivalente humaine, à l'aide de l'équation précédente. Pour tenir compte de la variabilité toxicodynamique et d'incertitudes résiduelles, un facteur d'incertitude supplémentaire a été fixé à 2,5 selon les recommandations de l'IPCS (IPCS, 2005) et sur la base des pratiques de l'Anses.
- Variabilité inter-individuelle (UF_H) : 10. Les données humaines observées sont en faveur de l'existence de populations sensibles : les enfants, selon l'étude de Rodrigue *et al.* (1990), ce qui a conduit à choisir une valeur par défaut de 10 pour la variabilité inter-individuelle.
- Insuffisance des données (UF_D) : 10. Les études épidémiologiques et expérimentales souffrent de divers biais. À ces derniers s'ajoutent d'autres lacunes telles que les informations disponibles sur la toxicité de chacun des variants de la STX. En outre, du fait de la sévérité de l'effet critique retenu et pour pallier les risques potentiels d'autres variants tels que la néoSTX, le CES choisit d'appliquer un UF_D de 10.

Un facteur d'incertitude global de 250 est donc utilisé pour la construction de la VTR.

- Proposition de VTR aiguë par voie orale

$$VTR = NOAEL_{HED} / UF = 22 / 250 = 0,088 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ p.c. .j}^{-1} \approx 0,1 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ p.c. .j}^{-1}$$

- Niveau de confiance

Un niveau de confiance global **faible** a été attribué à cette VTR en se basant sur les 4 critères suivants : la nature et la qualité du corpus de données (faible), le choix de l'effet critique et le mode d'action (fort), le choix de l'étude clé (moyen-faible) et le choix de la dose critique (faible). Ce niveau de confiance pourra être réévalué sous réserve de nouvelles études alimentant le corpus de données relatif à la toxicité de la STX.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions et recommandations du CES « Valeurs sanitaires de référence » qui portent sur la proposition d'une VTR aiguë par voie orale pour la STX.

Pour rappel, dans le cadre des scénarios généralement pris en compte en évaluation des risques sanitaires chez l'Homme, lorsqu'il est fait usage de VTR, l'Anses distingue trois types de durée d'exposition :

- les expositions aiguës, de 1 à 14 jours ;
- les expositions subchroniques, de 15 à 364 jours ;
- les expositions chroniques, à partir de 365 jours.

Une VTR aiguë par voie orale est proposée pour la STX, basée sur la dysfonction des muscles squelettiques. Un niveau de confiance **faible** a été attribué à cette VTR.

Tableau 5 : VTR aiguë par voie orale pour la STX

Effet critique (étude clé)	Concentration critique	UF	VTR
Dysfonction des muscles squelettiques Munday <i>et al.</i> 2013	NOAEL = 163 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ p.c .j ⁻¹	250	VTR = 0,1 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ p.c .j⁻¹
	<u>Ajustement allométrique</u> NOAEL _{HED} = 22 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ p.c .j ⁻¹	UF _A : 2,5 UF _D : 10 UF _H : 10 UF _L : 1 UF _S : 1	

L'Agence rappelle l'intervalle étroit entre les doses conduisant aux premiers effets néfastes observables et la mort des individus. Elle souscrit pleinement à la recommandation du CES visant à pallier le manque de connaissance sur cet intervalle *via* la réalisation d'une étude multipliant les doses d'exposition sur un intervalle de doses restreint.

Cette étude, réalisée par voie orale et utilisant la méthode HPLC, devra permettre de modéliser la pente correspondant à la relation dose-effet et d'en apprécier l'intensité. Au vu de la difficulté à quantifier les effets observés, l'étude devra prévoir de réaliser les tests de neurotoxicité les plus appropriés. Elle devra également caractériser la toxicité des variants de la STX, retrouvés en quantités non négligeables lors de cas d'intoxications humaines.

L'Agence souligne que la présente VTR est susceptible d'être réévaluée si une telle étude est publiée et permet d'alimenter les connaissances sur la toxicité relative à l'ingestion de la STX et de ses variants. Malgré le niveau de confiance faible défini pour cette VTR, l'Agence rappelle qu'étant donné la toxicité importante de la STX et l'enjeu de santé publique que représente les cyanotoxines pour les agences régionales de santé, il a été décidé par le CES de proposer une VTR pour la STX, ce qui représente un premier pas dans la protection des expositions potentielles de la population française à la STX. Enfin, l'Agence insiste sur la gravité des intoxications possibles si la VTR proposée est dépassée.

Dr Roger Genet

MOTS-CLES

Valeur toxicologique de référence, VTR, cyanobactéries, saxitoxine, aiguë, neurotoxicité

Key words

Toxicological reference value, TRV, cyanobacteria, saxitoxin, acute, neurotoxicity

Valeurs toxicologiques de référence (VTR)

Élaboration de VTR aiguë par voie orale pour la saxitoxine (CAS n°35523-89-8)

Mission permanente « Valeurs toxicologiques de référence »

Saisine « 2016-SA-0299 »
Saisine liée « 2016-SA-165 »

RAPPORT D'expertise collective

Comité d'experts spécialisé
« Valeurs sanitaires de référence »

Mars 2020

Mots clés

Valeur toxicologique de référence, VTR, cyanobactéries, saxitoxine, aiguë, neurotoxicité

Key words

Toxicological reference value, TRV, cyanobacteria, saxitoxin, acute, neurotoxicity

Présentation des intervenants

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

COMITE D'EXPERTS SPECIALISE

Les travaux, objets du présent rapport ont été suivis et adoptés par le CES suivant :

- CES « Valeurs sanitaires de référence » – 2017-2020

Président

M. Fabrice MICHIELS – Médecin du travail / toxicologue à l'Association Interentreprises pour la Santé au Travail 19 – Compétences : Médecine du travail, toxicologie

Membres

M. Marc BARIL – Professeur associé à l'Université de Montréal – Compétences : Chimiste toxicologue, hygiène industrielle

M. Stéphane BINET – Pharmacien toxicologue à la direction scientifique à l'INRS – Compétences : toxicologie générale et industrielle

Mme Michèle BISSON – Responsable d'étude à l'INERIS – Compétences : Pharmacien toxicologue, toxicologie générale

Mme Anne CHEVALIER – Retraitée de l'Institut de Veille Sanitaire - Compétences : épidémiologie

Mme Fatiha EL-GHISSASSI – Scientifique, Section des Monographies du CIRC (IMO) Centre International de Recherche sur le Cancer - Compétences : biochimie spécialiste en cancérogénèse et génotoxicité

Mme Mounia EL-YAMANI – Responsable d'unité à Santé publique France – Compétences : biochimie, toxicologie – Démission en juin 2019

M. Claude EMOND – Professeur adjoint de clinique à l'Université de Montréal – Compétences : Toxicologie, modèle PBPK, toxicocinétique, nanotoxicologie, perturbateurs endocriniens

M. Rex FITZGERALD – Expert en toxicologie réglementaire au Centre Suisse de Toxicologie Humaine Appliquée - Compétences : toxicologie de la reproduction, neurotoxicité du développement, évaluation des risques humains

M. Robert GARNIER – Médecin toxicologue, Centre antipoison de Paris - Compétences : Toxicologie médicale, médecine du travail

Mme Perrine HOET – Professeur à l'Université Catholique de Louvain. IREC – Compétences : médecine, toxicologie industrielle et environnementale

Mme Yuriko IWATSUBO – Médecin épidémiologiste à Santé publique France – Compétences : épidémiologie des risques professionnels

Mme Cécile KAIRO – Évaluateur de risques sanitaires à Santé publique France - Compétences : Docteur en pharmacie spécialisé en environnement, toxicologie générale et évaluation des risques

Mme Laila LAKHAL – Ingénieur INRA unité Toxalim - Compétences : Toxicologie, métabolisme, perturbateurs endocriniens

M. Frédéric LIRUSSI – Maître de Conférences des Universités– Praticien Hospitalier (MCU-PH) à l'UFR des Sciences de Santé & CHU de Dijon - Compétences : Toxicologie Clinique, Toxicologie analytique, Immunité Innée, Reprotoxicité

Mme Anne MAITRE – Professeur des Universités – Praticien Hospitalier (PU-PH) au Laboratoire de Toxicologie Professionnelle et Environnementale, CHU de Grenoble ; Responsable de l'équipe « Environnement et prédiction de la santé des populations », Laboratoire TIMC, Université Grenoble Alpes – Compétences : médecine, toxicologie, IBE, métrologie des polluants, hygiène industrielle

Mme Florence PILLIERE – Décédée en mars 2019

Mme Anne PLATEL – Maître de conférences à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille – Laboratoire de Toxicologie Génétique, Institut Pasteur de Lille - Compétences : Toxicologie, Génotoxicité, QSAR

M. Henri SCHROEDER – Enseignant chercheur à la Faculté des Sciences et Technologies de l'Université de Lorraine à Vandoeuvre-les-Nancy – Laboratoire CALBINOTOX, EA 7488 - Pharmacien neurobiologiste - Compétences : Neurotoxicité, polluants environnementaux, comportement animal, développement cérébral, exposition périnatale

M. Olivier SORG – Chef de groupe de recherche à l'Université de Genève - Compétences : Docteur es science en biochimie, toxicologie expérimentale, dermatotoxicologie

M. Jérôme THIREAU – Chargé de recherche au CNRS - Compétences : Docteur es science, physiologie animale, biologie cellulaire, cardiotoxicité

M. Claude VIAU – Professeur associé à l'université de Montréal – Compétences : Toxicologie, IBE, hygiène industrielle, métrologie des polluants

M. Raymond VINCENT - Retraité (anciennement Chargé de mission à la Direction Déléguée aux Applications (INRS)) - Compétences : chimie, métrologie des polluants, évaluation des risques professionnels

RAPPORTEURS

M. Frédéric LIRUSSI – Maître de Conférences des Universités– Praticien Hospitalier (MCU-PH) à l'UFR des Sciences de Santé & CHU de Dijon - Compétences : Toxicologie Clinique, Toxicologie analytique, Immunité Innée, Reprotoxicité

M. Olivier SORG – Chef de groupe de recherche à l'Université de Genève - Compétences : Docteur es science en biochimie, toxicologie expérimentale, dermatotoxicologie

PARTICIPATION ANSES

Coordination et contribution scientifique

M Nicolas FARION – chargé de projets scientifiques - unité d'évaluation des risques liés à l'eau.

Mme Carole CATASTINI – chef de projets scientifiques – unité d'évaluation des risques liés à l'eau.

Mme Esther CHABOT– stagiaire – unité d'évaluation des risques liés à l'eau.

Mme Pascale PANETIER– responsable de l'unité d'évaluation des risques liés à l'eau.

Secrétariat administratif

Mme Patricia RAHYR – Anses

SOMMAIRE

Présentation des intervenants	3
Sigles et abréviations	8
Liste des tableaux.....	10
Liste des figures	10
1 Contexte, objet et modalités de traitement de la saisine.....	11
1.1 Contexte.....	11
1.2 Objet de la saisine.....	11
1.1 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation.....	11
1.2 Prévention des risques de conflit d'intérêt	12
2 Informations générales.....	13
2.1 Cyanobactéries	13
2.2 Saxitoxine : caractéristiques et propriétés physico-chimiques.....	13
3 Synthèse des données toxicologiques	16
3.1 Toxicocinétique.....	16
3.1.1 Absorption	16
3.1.2 Distribution	16
3.1.3 Métabolisme.....	17
3.1.4 Excrétion	19
3.2 Toxicité aiguë	19
3.2.1 Effets aigus et subaigus.....	19
3.2.1.1 Données chez l'Homme	19
3.2.1.2 Données chez l'animal	21
3.2.2 Irritation	25
3.2.2.1 Données chez l'Homme	25
3.2.2.2 Données chez l'animal	26
3.2.3 Sensibilisation	26
3.2.3.1 Données chez l'Homme	26
3.2.3.2 Données chez l'animal	26
3.3 Toxicité subchronique et chronique	26
3.3.1 Données chez l'Homme.....	26
3.3.2 Données chez l'animal.....	26
3.3.2.1 Neurotoxicité	26
3.3.2.2 Autres effets toxiques.....	27

3.4 Effets sur la reproduction et le développement	27
3.4.1 Données chez l'Homme	27
3.4.2 Données chez l'animal	27
3.5 Génotoxicité	28
3.6 Cancérogénicité	28
3.7 Mécanismes d'action	28
3.7.1 Inhibition des canaux Na_v	29
3.7.2 Inhibition des canaux Ca_v	31
3.7.3 Inhibition des canaux K_v	31
3.8 Populations à risque	31
4 Élaboration de la valeur toxicologique de référence	32
4.1 VTR	32
4.1.1 VTR aiguës par voie orale	32
4.1.2 VTR subchroniques par voie orale	33
4.1.3 VTR chroniques par voie orale	33
4.1.3.1 VTR à seuil	33
4.1.3.2 VTR sans seuil	33
4.2 Valeurs guide dans l'eau	33
5 Proposition de VTR aiguë par voie orale	36
5.1 Choix de l'effet critique	36
5.2 Analyse des VTR existantes	37
5.3 Construction de VTR	37
5.3.1 Choix de l'étude-clé	37
5.3.2 Choix de la dose critique	37
5.3.3 Ajustement allométrique	38
5.3.4 Choix des facteurs d'incertitude	39
5.3.5 Proposition de VTR aiguë par voie orale	39
5.3.6 Niveau de confiance	39
6 Conclusions du CES	41
7 Bibliographie	42
ANNEXES	48
Annexe 1 : Lettre de saisine	49

Annexe 2 : Recherche bibliographique complémentaire sur la période 26/11/2018 au 17/12/2018 – mots clés.....51



Sigles et abréviations

ACAP	Antioxydant Capacity
ACh	Acétylcholine
ADME	Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion
Anses	Agence nationale de sécurité sanitaire alimentation environnement travail
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ARfD	Acute Reference Dose
BMD	Benchmark Dose
BMDL	Benchmark Dose Modelling
Canaux Ca _v	Canaux calcium sensibles au potentiel de membrane
Canaux K _v	Canaux potassium sensibles au potentiel de membrane
Canaux Na _v	Canaux sodium sensibles au potentiel de membrane
CAS	Chemical Abstract Service
CBMN	Cytokinesis-block micronucleus test
CES	Comité d'Experts Spécialisé
dcSTX	Décarbamoyle Saxitoxine
DJA	Dose Journalière Admissible
DL _{50%}	Dose Létale 50%
DA	Dopamine
DOPAC	acide 3,4-Dihydroxyphenylacétique
ECHA	European Chemical Agency (Agence européenne des substances chimiques)
EDCH	Eaux Destinées à la Consommation Humaine
EFSA	European Food Safety Authority (Agence européenne de Sécurité des aliments)
Éq-STX	Équivalent saxitoxine
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
FAO	Food and Agriculture Organization
GCL	Glutamate Cystéine Ligase
Gluc-STX	Glucuronic Saxitoxin
GST	Glutathion S-Transférase
GTX	Gonyautoxine
HABS	Harmful Algae Bloom Surveillance
HED	Human Equivalent Dose
hERG	human Ether-a-go-go-Related Gene
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IA	Inhibitory Avoidance
i.m	Intramusculaire
i.p	Intrapéritonéale
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
i.v	Intraveineuse
Kow	Coefficient de partage octanol/eau
LOAEL	Low Observed Adverse Effect Level

LPS	Lipopolysaccharide
MBA	Mouse Bio Assay
MC-LR	Microcystine LR
mu	Mouse unit
MWN	Morris Water Maze
NéoSTX	Néosaxitoxine
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level
NRC	National Research Council of Canada
OHA	Oregon Health Authority
p.c	Poids corporel
PBPK	Physiologically-Based Pharmacokinetic
PPase	Protéines phosphatase
PSP	Paralytic Shellfish Poisoning
PST	Paralytic Shellfish Toxin
RfD	Reference Dose
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
SOD	Superoxyde Dismutase
STX	Saxitoxine
UF	Facteur d'incertitude (Uncertainty Factor)
UF _A	Facteur d'incertitude inter-espèces
UF _{B/L}	Facteur d'incertitude lié à l'utilisation d'un LOAEL ou d'une BMD
UF _H	Facteur d'incertitude interindividuel
UF _D	Facteur d'incertitude au manque de données
UFS	Facteur d'incertitude lié à la transposition subchronique à chronique
TEF	Toxicity Equivalent Factor
ToxRTool	Toxicological data Reliability assessment Tool
TDI	Tolerable Daily Intake
TTX	Térodotoxine
VSR	Valeurs sanitaires de référence
VTR	Valeur Toxicologique de Référence

Liste des tableaux

Tableau 1 : Identification de la substance et propriétés physico-chimiques	14
Tableau 2 : Résultats d'études expérimentales de toxicologie aiguë de la STX et de ses variants par différentes types de voies orales chez différentes espèces de vertébrés	23
Tableau 3 : Résultats d'études expérimentales de toxicologie aiguë de la STX et de ses variants par différentes voies intraveineuse, intrapéritonéale, sous-cutanée et intramusculaire chez différentes espèces de vertébrés	25
Tableau 4 : Recensement des valeurs toxicologiques de références par voie orale pour la STX.....	32
Tableau 5 : Recueil des valeurs de références disponibles.	35

Liste des figures

Figure 1- Structure de la saxitoxine et de ses variants	15
Figure 2 - Voie métabolique proposée pour les réactions d'oxydation et de glucuronidation des toxines des coquillages paralytiques (PST) (Garcia <i>et al.</i> , 2010)	18
Figure 3 : Relation structure-fonction du Nav (Bourdin 2013).....	30

1 Contexte, objet et modalités de traitement de la saisine

1.1 Contexte

Une valeur toxicologique de référence, ou VTR, est un indice toxicologique qui permet de qualifier ou de quantifier un risque pour la santé humaine. Elle établit le lien entre une exposition à une substance toxique et l'occurrence d'un effet sanitaire indésirable. Les VTR sont spécifiques d'une durée d'exposition (aiguë, subchronique ou chronique) et d'une voie d'exposition (orale, cutanéo-muqueuse ou respiratoire). La construction des VTR diffère en fonction des connaissances ou des hypothèses formulées sur les mécanismes d'action des substances. Actuellement, l'hypothèse par défaut est de considérer une relation monotone entre l'exposition, ou la dose, et l'effet, ou la réponse. En l'état actuel des connaissances et par défaut, on considère généralement que, pour les effets non cancérogènes, la toxicité ne s'exprime qu'au-delà d'un seuil de dose (Anses, 2017).

En pratique, la construction de la VTR à seuil comprend les quatre étapes suivantes :

- choix de l'effet critique ;
- choix d'une étude de bonne qualité scientifique permettant généralement d'établir une relation dose – réponse ;
- choix ou construction d'une dose critique à partir des doses expérimentales et/ou des données épidémiologiques ;
- application de facteurs d'incertitude à la dose critique pour tenir compte des incertitudes.

L'élaboration des VTR suit une approche structurée et exigeante qui implique des évaluations collectives par des groupes de spécialistes.

1.2 Objet de la saisine

Le Directeur général de la santé a saisi l'Anses le 19 juillet 2016 d'une demande d'actualisation de l'évaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries et de leurs toxines dans les eaux destinées à la consommation humaine (EDCH), à la baignade et autres activités récréatives (annexe 1).

L'un des objectifs de ce travail est d'actualiser le corpus documentaire relatif à la toxicité des cyanobactéries et le cas échéant, sélectionner ou construire de nouvelles valeurs toxicologiques de référence représentatives de scénarios d'exposition liés à l'ingestion d'EDCH ou d'eau pendant les activités aquatiques récréatives telle que la baignade. Dans le cadre de cette saisine, une VTR aiguë par voie orale liée à l'ingestion de saxitoxine (STX) est proposée.

1.1 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

L'Anses a confié au comité d'experts spécialisé (CES) « Eaux » l'instruction de cette saisine. Le CES « Valeurs sanitaires de référence » (VSR) a été mandaté pour évaluer les VTR existantes et valider la présente VTR.

Les travaux d'expertise ont été soumis régulièrement aux deux CES tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques et tiennent compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres des CES. Les travaux ont été adoptés par le CES VSR réuni le 17 octobre 2019.

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

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

1.2 Prévention des risques de conflit d'intérêt

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

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet de l'agence (www.anses.fr).

2 Informations générales

2.1 Cyanobactéries

Anciennement appelées « algues bleues » ou « algues bleu-vert », les cyanobactéries sont des micro-organismes procaryotes à Gram négatif dont la pigmentation peut varier du bleu-vert au rouge (De Reviers, 2002, 2003). On les trouve aujourd'hui dans la plupart des écosystèmes.

Les cyanobactéries sont des procaryotes photosynthétiques, classées du point de vue systématique dans le règne des Eubactéries. À l'instar des autres bactéries, leur structure cellulaire est caractérisée par l'absence de noyau et d'organites intracellulaires. Ces micro-organismes ont longtemps été associés au règne végétal car ils présentent également des caractéristiques propres aux algues vivant dans les eaux continentales et les milieux marins. Comme les végétaux, les cyanobactéries possèdent de la chlorophylle-a, et non de la bactériochlorophylle comme certaines bactéries. Elles renferment généralement, comme autres pigments photosynthétiques, des phycobiliprotéines et réalisent une photosynthèse productrice d'oxygène en utilisant l'eau comme donneur d'électrons.

La multiplication des cyanobactéries est végétative, c'est-à-dire asexuée, et s'effectue par division binaire d'une cellule mère en deux cellules filles, par bourgeonnement ou par divisions multiples. Selon les espèces et les conditions environnementales, les temps de doublement des populations varient de quelques heures à plusieurs jours.

Dans des conditions qui leur sont favorables, ces cyanobactéries connaissent des phases de prolifération massive aussi nommées d'efflorescences (« bloom » en anglais). Durant ces phases de prolifération massive, se développe une biomasse importante et une ou deux espèces deviennent alors très largement dominante(s) (Ianora *et al.*, 2011). Les effets indésirables pour l'environnement et la santé humaine peuvent être alors nombreux.

En effet, ces micro-organismes peuvent produire et libérer des toxines appelées cyanotoxines, ou d'autres composés bioactifs, capables d'agir sur différents organes-cibles telles que le foie et le système nerveux. L'Homme est exposé aux cyanotoxines principalement par ingestion d'EDCH ou accidentellement lors d'activités récréatives aquatiques. La présence de cyanobactéries, signalée sur tous les continents, est source de préoccupation croissante vis-à-vis des risques sanitaires associés pour l'Homme et l'animal (Testai *et al.*, 2016).

La saxitoxine (STX) est une neurotoxine produite naturellement par certaines espèces de dinoflagellés marins : *Alexandrium sp.*, *Gymnodinium sp.*, *Pyrodinium sp.* (Hackett *et al.*, 2013) et des cyanobactéries principalement dulcicoles, dont certaines espèces des genres : *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya* et *Planktothrix*. L'ingestion de STX est responsable de la maladie humaine connue sous le nom d'intoxication paralysante par les mollusques (en anglais paralytic shellfish poisoning ou PSP)¹. Ces intoxications surviennent habituellement lors de la consommation de mollusques (huîtres, palourdes) contaminés majoritairement par des proliférations de dinoflagellés toxiques, étant donné leur prévalence importante en milieu marin par rapport aux cyanobactéries productrices de toxines.

2.2 Saxitoxine : caractéristiques et propriétés physico-chimiques

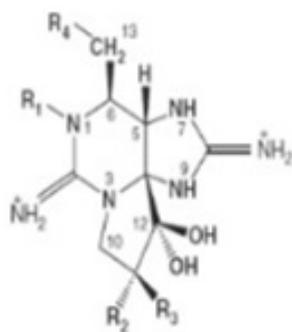
La STX et ses variants, communément appelés famille des STX (Tableau 1), sont des toxines guanidiques (Figure 1) qui doivent leur nom à la palourde d'Alaska, *Saxidomus giganteus*, à partir de laquelle la STX a été purifiée en 1957 (Schantz *et al.*, 1957 ; Llewellyn, 2006). Outre la consommation de mollusques, les intoxications paralysantes peuvent survenir après consommation de crustacés et de poissons. Depuis sa découverte dans des mollusques, 57 variants structuraux de la STX ont été décrits (Wiese *et al.*, 2010).

¹ Source : (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Saxitoxin#section=Human-Metabolite-Information>)

Tableau 1 : Identification de la substance et propriétés physico-chimiques²

Nom	Saxitoxine
Numéro CAS	35523-89-8
Abréviation	STX
Nom IUPAC	[(3aS,4R,10aS)-2,6-diamino-10,10-dihydroxy-3a,4,8,9-tetrahydro-1H-pyrrolo[1,2-c]purine-4-yl]méthyl carbamate
Formule	C ₁₀ H ₁₇ N ₇ O ₄
Poids moléculaire	299,29 g/mol

² Source : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Saxitoxin>



Division	Acronym (Synonym)	Name	R1	R2	R3	R4
Carbamate	STX	saxitoxin	H	H	H	OCONH ₂
	NeoSTX	neosaxitoxin	OH	H	H	
	GTX1	Gonyautoxin 1	OH	H	OSO ₃ ⁻	
	GTX2		H	H	OSO ₃ ⁻	
	GTX3		H	OSO ₃ ⁻	H	
	GTX4		OH	OSO ₃ ⁻	H	
Decarbamoyl	dcSTX	Decarbamoyl saxitoxin	H	H	H	OH
	dcGTX2		H	H	OSO ₃ ⁻	
	dcGTX3		H	OSO ₃ ⁻	H	
<i>N</i> -sulfocarbamoyl	B1(GTX5)	Carbamoyl- <i>N</i> -sulfosaxitoxin	H	H	H	OCONHSO ₃ ⁻
	B2(GTX6)		OH	H	H	
	C1(EpiGTX8)		OH	H	OSO ₃ ⁻	
	C2(GTX8)		H	OSO ₃ ⁻	H	
	C3	Carbamoyl- <i>N</i> -sulfogonyautoxin-1	H	H	OSO ₃ ⁻	
	C4	Carbamoyl- <i>N</i> -sulfogonyautoxin-4	OH	OSO ₃ ⁻	H	

Figure 1- Structure de la saxitoxine et de ses variants

3 Synthèse des données toxicologiques

La synthèse des données toxicologiques a été rédigée sur la base du rapport de l'Agence européenne de sécurité des aliments (« European Food Safety Authority » ou EFSA) publiée en 2009 (EFSA, 2009) complétée par une recherche bibliographique réalisée entre le 26 novembre et le 17 décembre 2018. Le détail de cette recherche bibliographique est présenté en annexe 2.

3.1 Toxicocinétique

3.1.1 Absorption

Lors d'une exposition par voie orale, la STX et ses variants franchissent la barrière intestinale par des voies para- et transcellulaires, comme le prouvent des observations *in vitro* (cellules Caco-2 et IEC-6) et *ex vivo* (biopsies d'intestin humain) (Andrinolo *et al.*, 2002 ; Andrinolo, *et al.*, 2002 ; Torres *et al.*, 2007). Après le passage de la barrière intestinale, la STX accède à la circulation sanguine générale malgré l'effet de premier passage hépatique, ce qui lui donne accès au système nerveux périphérique (SNP), lequel est sa cible principale. Cependant, les études expérimentales *in vivo* montrent que l'absorption intestinale limite la toxicité de la STX et de ses variants, par rapport aux autres voies qui s'affranchissent du passage intestinal (Andrinolo *et al.*, 2002 ; Torres *et al.*, 2007). En effet, les diverses études détaillées dans la suite de ce rapport montrent que lors d'une injection intrapéritonéale (i.p) ou intraveineuse (i.v) chez des souris, les doses létales 50% (DL₅₀) sont plus faibles que par administration par voie orale.

Enfin, selon l'étude de Selwood *et al.* (2017), la toxicité de la STX et de ses variants est plus élevée par gavage que par voie alimentaire chez les souris. Selon les auteurs, lors d'une exposition par gavage le contenu gastrique semi-solide des rongeurs ne permettrait pas le mélange des toxines administrées, qui circuleraient donc autour du contenu gastrique et pénétreraient ainsi rapidement dans le duodénum afin d'y être absorbées. À l'inverse, lors d'une administration par voie alimentaire, la quantité de toxines à tester se mélangerait avec le contenu gastrique des rongeurs de la même manière que les toxines se répartissent dans le contenu liquide de l'estomac humain. Ceci entraînerait une libération relativement lente dans les zones d'absorption du tractus gastro-intestinal et entraînerait de fait une moindre toxicité.

Lors d'une exposition par voie cutanée, les résultats d'une étude suggèrent que les toxines - dont le logarithme du coefficient de partage octanol-eau³ (Log Kow) sont de l'ordre de -2 à -3, ce qui en fait donc de mauvais candidats pour une pénétration transcutanée - peuvent également pénétrer l'épiderme *via* des plaies éventuelles ou les pores de glandes sudorales (Rapala *et al.*, 2005).

3.1.2 Distribution

Lors d'une administration par voie i.p chez le rat à des doses de 5 et 10 µg.kg⁻¹, une partie de la STX traverse la barrière hémato-encéphalique et est retrouvée dans différentes régions du cerveau (Cianca *et al.*, 2007). Après injection intraveineuse unique chez le rat, la STX se distribue rapidement dans la circulation sanguine puis dans le reste de l'organisme (Garcia *et al.*, 2004 ; Andrinolo *et al.*, 1999).

Chez l'Homme, la STX et ses variants sont également distribués dans de nombreux organes, tissus et fluides biologiques : cerveau, bile, liquide céphalo-rachidien, foie, rate, cœur, thyroïde, glandes surrénales, reins, pancréas et poumons et ce quelle que soit la voie considérée.

³ Log Kow : Il correspond au ratio entre la concentration de substance dans l'octanol et celle dans l'eau à l'équilibre. Il est corrélé à la solubilité dans l'eau et reflète indirectement les potentiels de bioaccumulation et de bioconcentration d'une substance.

3.1.3 Métabolisme

La conversion métabolique de la STX et ses variants chez les mammifères reste imparfaitement caractérisée (Llewellyn, 2006). Toutefois, un cas d'intoxication humaine a rapporté de manière précise que la STX était majoritaire dans le tractus digestif à hauteur de 82%, alors que l'urine ne contenait que 48,7% de STX, les formes néosaxitoxine (néoSTX) et décarbamoylsaxitoxine (dcSTX) étant les plus importantes des autres variants identifiées (Llewellyn *et al.*, 2002). Cette différence de variants met en évidence que la STX est métabolisée en divers variants tels que la néoSTX et la dcSTX dans le corps humain. Des analyses de fluides biologiques, sang et urine, prélevés sur des personnes intoxiquées, ont montré la prédominance de certains variants (STX, N-sulfocarbamoyle gonyautoxine 1 dit C1) par rapport à d'autres qui leur sont structurellement proches (GTX2).

D'autre part, l'étude de Garcia *et al.* (2004), relative à des cas d'intoxication humaine par la STX et ses variants en Patagonie, a montré que les toxines présentes dans le contenu gastrique étaient la STX et les gonyautoxines (GTX1, GTX2, GTX3, GTX4 et GTX5). La quantité de chacune de ces toxines présente dans le contenu gastrique s'est avérée, d'après les échantillons biologiques des personnes intoxiquées, être la quantité observée la plus élevée de tout l'organisme. Les analyses d'échantillons d'urine et de bile ont montré dans cette étude que les variants néoSTX et GTX4 / GTX1, deux variants de STX avec un groupe hydroxyle (-OH) dans le N1 du noyau tétrahydropurine, constituaient les toxines majoritairement présentes dans ces échantillons.

Néanmoins, la néoSTX n'était pas présente dans les échantillons de contenu gastrique, ce qui indique que l'oxydation de N1 dans le noyau de la tétrahydropurine STX entraînait la formation de néoSTX, de la même manière que les variants GTX3 / GTX2 ont été transformés en variants GTX4 / GTX1. Outre cette transformation métabolique, l'hydrolyse du groupe carbamoyle de STX pour former son variant décarbamoyl, la dcSTX, a également été détectée dans le foie, les reins et les poumons (Garcia *et al.*, 2004).

Ces deux résultats montrent que la STX et ses variants initialement présents dans le contenu gastrique subissent des transformations métaboliques pendant les 3 à 4 heures qui suivent une intoxication humaine. La transformation majoritaire de la STX et des variants GTX3 / GTX2 est l'oxydation enzymatique de N1 dans le noyau de la tétrahydropurine, produisant respectivement des variants néoSTX et GTX4 / GTX1.

L'étude de Garcia *et al.* (2010), résume les réactions d'oxydation et de glucuronidation séquentielles à partir de la STX (Figure 2).

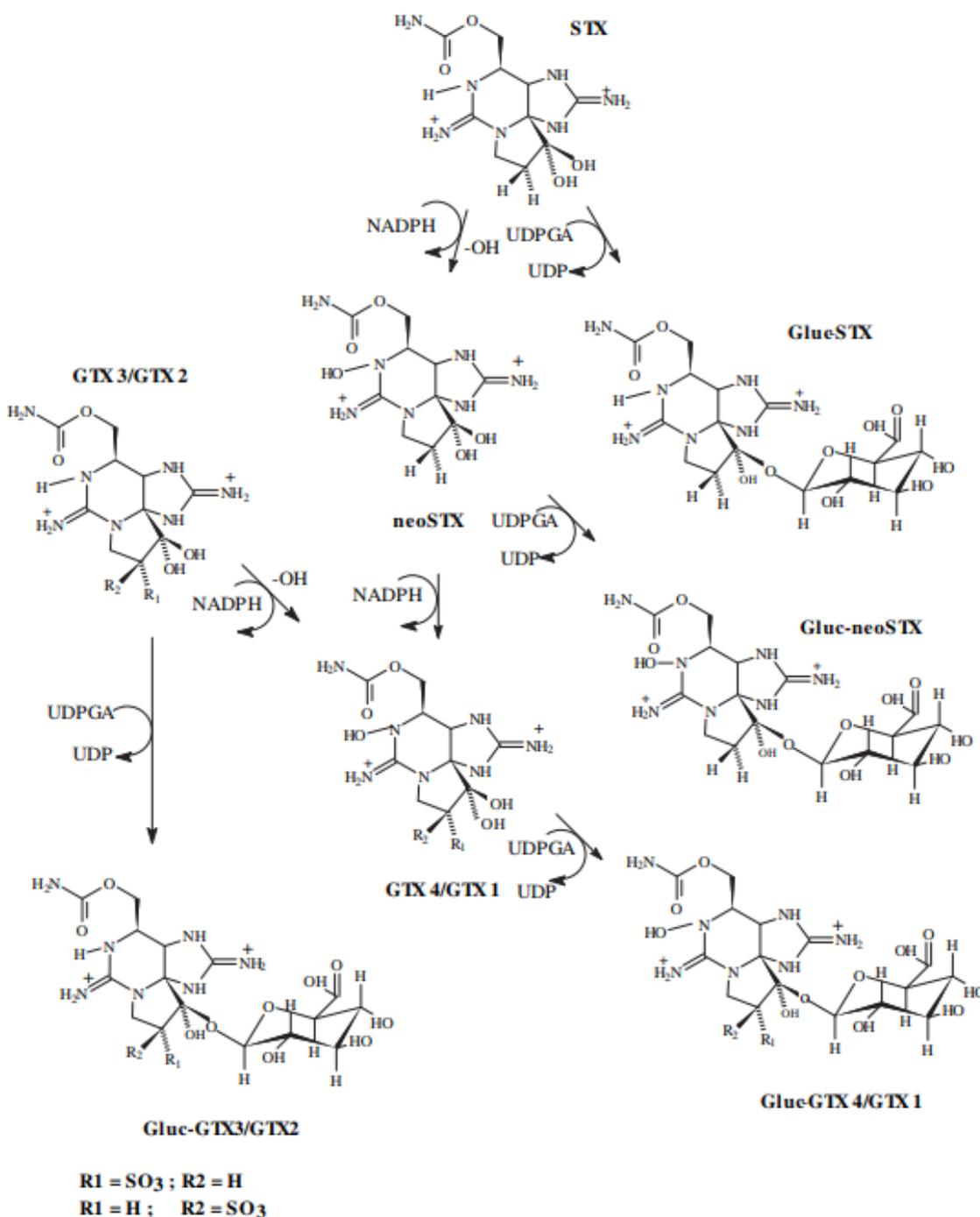


Figure 2 - Voie métabolique proposée pour les réactions d'oxydation et de glucuronidation des toxines des coquillages paralytiques (PST) (Garcia *et al.*, 2010)

La STX et ses variants sont donc bien métabolisés avant d'être éliminés. Cependant, la métabolisation de la STX et de ses variants chez l'Homme devrait être davantage caractérisé, en particulier pour déterminer s'il résulte d'une métabolisation par les enzymes du métabolisme des xénobiotiques de l'organisme et/ou est le résultat d'une modification par les bactéries du tractus digestif avant son passage dans la circulation. En effet, chez des bactéries (des genres *Vibrio* et *Pseudoalteromonas*) présentes dans les organismes invertébrés marins, la métabolisation des STX montre une conversion des GTX en STX et néoSTX. Chez certains organismes marins vecteurs d'intoxication humaine, la STX et ses variants sont susceptibles d'être métabolisés et peuvent ainsi conduire à la formation d'autres variants de la STX. La connaissance de l'ensemble des voies de

métabolisation/détoxication pourrait permettre d'améliorer la prise en charge et le traitement des personnes intoxiquées (Wiese *et al.*, 2010).

3.1.4 Excrétion

Les réactions d'oxydation (phase I) et de glucuronidation (phase II) sont le point de départ de la métabolisation et de l'excrétion de ces toxines. Les glucuronides qui en résultent, qui sont souvent le produit final du métabolisme, sont éliminés majoritairement *via* les urines ou minoritairement par la bile (Garcia *et al.*, 2010 ; Testai *et al.*, 2016). L'efficacité de l'excrétion des STX dépend également de leur affinité pour les différents sous-types de canaux sodium (Na^+) voltage-dépendants, appelés Na_v .

D'autres études corroborent ces résultats, notamment celles qui montrent que les variants GTX-2 et -3 sont principalement excrétés par filtration glomérulaire chez l'Homme et l'animal (Andrinolo *et al.*, 1999 ; Andrinolo *et al.*, 2002). Récemment, un cas de PSP en Alaska a attesté de l'élimination par voie rénale de la STX ainsi que d'autres PST lors d'une analyse de l'urine de la patiente par chromatographie liquide haute performance (HPLC) (Coleman *et al.*, 2018).

Selon les études, les espèces considérées et la matrice biologique retenue, la demi-vie d'élimination est comprise entre 1h30 et 10h, ce qui est en accord avec la courte durée des symptômes observés lors d'intoxication (Kao, 1993 ; Andrinolo *et al.*, 1999 ; Gessner *et al.*, 1997).

S'agissant d'une potentielle élimination fécale, les études expérimentales montrent que cette voie semble être largement minoritaire voire inexistante. En effet, une étude réalisée avec du saxitoxinol tritié a mis en évidence que 60% des molécules radiomarquées étaient excrétées dans les urines tandis qu'aucune radioactivité n'était mise en évidence dans les fécès (Hines *et al.*, 1993). Une seconde étude centrée sur la toxicocinétique de la STX a quant à elle montré que 68% de la STX injectée était éliminée par les urines, sans investiguer les autres voies possibles d'élimination. Cette étude suppose néanmoins que la rétention de STX dans le corps, le métabolisme et l'excrétion dans les matières fécales sont des explications potentielles à la non excrétion dans les urines (Stafford et Hines, 1995). Toutefois, l'élimination fécale semble peu probable car une autre étude expérimentale postérieure ayant contrôlé spécifiquement cette voie d'élimination a écarté cette possibilité, démontrant que l'élimination urinaire était la seule voie d'élimination (Andrinolo *et al.*, 1999).

Par analogie avec le métabolisme de la STX, une étude expérimentale récente réalisée chez des rats, focalisée sur le métabolisme de la tétrodoxtine (TTX), de structure, mode d'action et toxicité proches de la STX, a mis en évidence que l'excrétion biliaire de la toxine représentait 0,43% de l'élimination totale (Hong *et al.*, 2017).

3.2 Toxicité aiguë

Les études expérimentales disponibles ont majoritairement été réalisées en exposant les animaux *via* plusieurs voies d'exposition différentes : eau de boisson, gavage, voie i.v ou i.p. Ces études de toxicité aiguë décrivent essentiellement des DL_{50} sans que les auteurs n'aient tenté de caractériser une relation dose-effet, car le mécanisme de toxicité de la STX et de ses variants rend l'établissement d'une relation dose-effet extrêmement difficile.

Les cas d'intoxications humaines aiguës disponibles confirment néanmoins le mécanisme d'action de la STX et de ses variants observés dans les études expérimentales, qui est identique quelle que soit l'espèce exposée à la toxine.

3.2.1 Effets aigus et subaigus

3.2.1.1 Données chez l'Homme

Le nombre annuel de cas de PSP dans le monde est estimé à 1600, dont environ 300 seront mortels. Au cours de certains de ces épisodes d'intoxications humaines, les taux de mortalité ont atteint 40% (FAO, 2003). De ce fait, de nombreuses études relatent des épisodes d'intoxication par la STX ou ses variants chez l'Homme.

Ces études présentent l'inconvénient majeur d'estimer la quantité de toxines à laquelle les individus sont exposés *via* le bioessai sur souris appelé « Mouse Bio Assay » (MBA) qui était jusqu'au 1^{er} janvier 2019 la méthode de référence pour la détection des PST en Europe. Le MBA pour les toxines paralysantes constitue une méthode biologique validée par l'AOAC (« Association of Official Analytical Chemist ») pour la recherche de toxines lipophiles. Il permet de détecter et quantifier la toxicité globale des coquillages, basée sur la réponse biologique de l'animal. Le test est déclaré positif si au moins 2 souris sur 3 meurent dans les 24h suivant l'injection (Afssa 2008, Anses 2019). Malheureusement le MBA, en plus de ses inconvénients éthiques, présente divers biais et ne permet pas d'estimer avec certitude les quantités de toxines auxquelles les individus intoxiqués sont exposés. En effet, le MBA permet seulement d'établir une corrélation approximative entre les doses de toxines testées et le délai avant apparition des symptômes, et l'unité du résultat obtenu : le « mouse unit » dépend notamment de la souche de souris utilisée. D'autre part, le MBA prend en compte l'ensemble des PST pouvant être à l'origine d'un PSP, et n'est donc pas spécifique de la STX. Enfin, le MBA a l'inconvénient d'être réalisé par voie i.p, peu représentative des scénarios d'exposition humaine (Testai *et al.*, 2016). Ce test a donc été remplacé par la méthode de chromatographie liquide couplée à un détecteur à fluorescence, dite méthode de « Lawrence », qui est désormais la méthode officielle de l'AOAC⁴.

Les PSP incluent majoritairement des signes neurologiques et musculaires. Elles sont bien caractérisées pour l'ingestion de nourriture d'origine marine. Les symptômes chez l'Homme après la consommation d'aliments contaminés vont d'effets neurologiques et gastro-intestinaux légers à une paralysie respiratoire fatale (Arnich et Thébault, 2018). Plus précisément, des symptômes tels que des paresthésies de type picotements, fourmillements ou engourdissement péribuccal et des extrémités, apparaissent rapidement. Ces signes précoces peuvent être suivis de parésies et de paralysies musculaires, engageant le pronostic vital en cas d'atteinte des muscles respiratoires.

D'autres symptômes tels que des céphalées, une hypersalivation, une soif intense, des sueurs, des vomissements, une diarrhée et des douleurs digestives peuvent également avoir lieu lors d'une intoxication (Rapala *et al.*, 2005). Au-delà de 12 heures, quand les troubles respiratoires n'ont pas entraîné le décès de la personne intoxiquée, l'évolution est favorable en quelques heures à quelques jours. Il n'existe à ce jour aucun traitement spécifique : la prise en charge est donc symptomatique, pour les troubles qui le nécessitent.

La méta-analyse la plus récente réalisée à partir de cas d'intoxications humaines, a cherché à établir une relation significative entre l'exposition à la STX et ses variants et la gravité des symptômes (Arnich et Thébault, 2018). Cette méta-analyse, fondée sur un panel de 16 études dont 12 avaient été utilisées par les experts du « Panel on Contaminants in the Food Chain » de l'EFSA, établit une dose minimale critique de $0,37 \mu\text{g} \text{ \acute{e}q-STX.kg}^{-1}$ p.c correspondant à une probabilité supérieure à 10% de présenter les symptômes. Ceci signifie que 10% des personnes exposées à cette dose de $0,37 \mu\text{g} \text{ \acute{e}q-STX.kg}^{-1}$ p.c. auraient des symptômes (sans tenir compte de leur gravité). Cette dose minimale critique a été élaborée sur la base d'un modèle *logit* ou *probit*, explorant la relation entre la dose et la gravité des symptômes. Les probabilités de survenue des symptômes, divisés en cinq classes par les auteures en fonction de la consommation de toxines ingérées, ont ensuite été prédites *via* un modèle ordinal permettant d'aboutir à cette dose de $0,37 \mu\text{g} \text{ \acute{e}q-STX.kg}^{-1}$ p.c. Ce résultat correspond dans la méta-analyse à la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95%, et est décrit comme comparable à l'approche BMDL (« lower bound of the benchmark dose confidence interval ») ou limite inférieure de l'intervalle de confiance de la dose repère. La relation dose-effet permettant d'établir cette dose minimale critique a nécessité d'écarter 2 études sans raison évidente, parmi les 16 retenues par les auteures, dont une (Gessner et Middaugh, 1995) également utilisée par l'EFSA.

⁴ Règlement (UE) 2017/1980 de la Commission du 31 octobre 2017 modifiant l'annexe III du règlement (CE) n° 2074/2005 en ce qui concerne la méthode de détection des toxines paralysantes (« paralytic shellfish poison » - PSP)

La dose critique retenue par les auteures, de la méta-analyse est comparée au LOAEL de 1,5 µg éq-STX.kg⁻¹ p.c. défini par l'EFSA, celle-ci représente une dose environ quatre fois inférieure au LOAEL établi par l'EFSA (Arnich et Thébault, 2018).

3.2.1.2 Données chez l'animal

Lors des études expérimentales, les animaux sont généralement exposés à la STX ou ses variants par prise de nourriture, gavage, voie i.v ou i.p. Les valeurs des DL₅₀ sur vertébrés sont de l'ordre de quelques microgrammes par kilogramme (µg.kg⁻¹) à plusieurs centaines de µg.kg⁻¹, en fonction de la voie d'administration (Tableau 2).

Le CES VSR a retenu trois études expérimentales réalisées chez des souris, comme les plus informatives sur la toxicité de la STX et de ses variants chez l'animal : Munday *et al.* (2013) ; Selwood *et al.* (2017) et Finch *et al.*, (2018) possédant le même protocole d'étude et ayant été réalisées par les mêmes équipes de chercheurs.

Les toxines utilisées dans ces trois études ont toutes été purifiées dans le même laboratoire, le « National Research Council of Canada » (NRC). Les animaux utilisés, des souris femelles de souche « Swiss albino », ont toutes été élevées au centre « AgResearch » basé à Ruakura en Nouvelle-Zélande. Ces animaux avaient le même accès (non limité) à la même nourriture et la même eau potable issue des robinets du centre d'expérimentation.

En outre, ces trois études ont calculé des doses létales médianes *via* le test du MBA, suivant la ligne directrice 425 de l'OCDE. Selon cette ligne directrice, un premier animal reçoit une dose du matériel d'essai à un niveau inférieur au niveau de la meilleure estimation de la DL₅₀. Si cet animal survit, la dose pour l'animal suivant est augmentée d'un facteur 10. Si l'animal meurt, le même facteur diminue la dose pour l'animal suivant. La posologie est maintenue jusqu'à ce que 4 renversements soient atteints, un renversement étant une situation dans laquelle la mort est observée à une dose particulière mais pas à la dose immédiatement inférieure, ou une situation dans laquelle un animal survit à une dose donnée mais meurt à la prochaine dose plus élevée selon la méthode de calcul.

Après l'exposition aiguë à la STX ou à ses variants, les animaux étaient surveillés selon les mêmes modalités pendant 14 jours, dans les trois études.

L'étude de Munday *et al.* (2013) met en évidence que les toxicités aiguës de tous les variants STX par gavage sont significativement plus faibles que celles par injection i.p, et que les toxicités aiguës par l'alimentation sont plus faibles que celles par gavage. D'autre part, la néoSTX est rapportée comme significativement plus toxique que la STX par gavage et par l'alimentation. Les GTX-1 & 4 sont selon les résultats de l'étude significativement moins toxiques que la STX par gavage, mais de toxicité similaire par l'alimentation. La dcSTX et les GTX-2 & 3 sont significativement moins toxiques que la STX, à la fois par gavage et par alimentation. Il est important de souligner que les facteurs d'équivalence de toxicité, communément appelés TEF (« Toxicity Equivalence Factors ») en anglais, relatifs aux variants de la STX, présentent une grande disparité de valeurs dans la littérature scientifique. L'étude de Selwood *et al.* (2017) suggère d'ailleurs de réviser les valeurs définies par l'EFSA en 2009.

Les indicateurs les plus sensibles des effets sublétaux mentionnés dans l'étude de Munday *et al.* (2013) sont une respiration abdominale, la léthargie et une diminution du comportement exploratoire des souris. L'étude signale qu'une diminution de la force de préhension n'est observée qu'à des doses légèrement inférieures à la DL₅₀. Par ailleurs, bien que les premiers symptômes soient identiques quelle que soit la voie d'administration, leur apparition est retardée de 20 à 40 minutes lors d'une administration orale. Les délais de décès, et de récupération aux doses sublétales, sont également plus longs par voie orale que ceux enregistrés après administration par injection i.p. L'étude de Munday *et al.* (2013) rapporte que par gavage, les décès surviennent 5 à 7 heures après l'administration de doses létales et la récupération après l'administration de doses sublétales n'est pas complète avant 4 à 8 heures après l'administration. *Via* l'alimentation, les animaux décèdent dans les 7 heures suivant l'administration et, à des doses sublétales, restent léthargiques jusqu'à 10 heures.

L'étude de Selwood *et al.* (2017) ne présente pas de résultats pour la STX en elle-même, mais développe les résultats de variants de la STX, à savoir : GTX5, GTX6, dcGTX-2 & 3, dcnéoSTX, C1 & 2 ainsi que C3 & 4. Cette étude relate également que quelques minutes après l'administration d'une dose létale de PST, les souris sont prostrées et présentent une respiration abdominale rapide. Au cours de l'intoxication, la fréquence respiratoire diminue jusqu'à l'arrêt respiratoire. Celui-ci est précédé d'une exophtalmie et d'une cyanose 20 minutes après l'administration de PST, à l'exception des toxines C3 et C4 (Selwood *et al.*, 2017). À des doses sublétales, les souris présentent un état léthargique, avec respiration abdominale et à des doses proches de la DL₅₀, une diminution de la fréquence respiratoire a également été observée. Suite à l'administration d'une dose sublétales, la période de récupération des souris s'étend de 1 à 5 heures post-injection, à la suite de laquelle les souris ne présentent pas de séquelles. Par voie orale, les symptômes d'intoxication sont identiques à ceux qui sont observés par voie i.p, mais tout comme pour l'étude de Munday *et al.* (2013), le délai d'apparition est plus important (jusqu'à une heure après l'administration *per os*). Le temps de récupération après administration d'une dose sublétales de toxines est également étendu (Selwood *et al.*, 2017).

Afin de déterminer les NOAEL des variants de la STX, l'étude suit également la ligne directrice OCDE n°425 mais les auteurs prennent comme paramètre principal un "effet toxique" plutôt que la mort des animaux. À la différence de l'étude Munday *et al.* (2013), l'étude de Selwood *et al.* (2017) mentionne que le comportement exploratoire des souris est évalué en transférant les souris dans une nouvelle cage et en observant leurs mouvements. La respiration abdominale et la léthargie sont quant à elles évaluées visuellement.

L'étude de Selwood *et al.* (2017) étant fondée sur la caractérisation de la toxicité des variants susmentionnés de la STX, la conclusion principale de l'étude est que les TEF actuellement utilisés et définis par l'EFSA (EFSA, 2009) pour certains de ces variants devraient être révisés sur la base des données de toxicité par voie orale disponibles. Cette conclusion mentionne en outre qu'un rapport d'un groupe d'experts de la FAO est arrivé en 2016 à une recommandation similaire (FAO/WHO, 2016).

L'étude de Finch *et al.* (2018) conforte les résultats des DL₅₀ de la STX obtenues dans l'étude de Munday *et al.* (2013) car les résultats sont sensiblement similaires (Tableau 2).

Cependant le but initial de l'étude étant de caractériser la toxicité de mélanges de STX et de TTX, les résultats de cette étude sont discutés au regard de cet objectif. L'étude met en évidence que les signes cliniques de toxicité induits par la STX et la TTX administrées par voie orale ne sont pas différenciables. Pour les deux toxines administrées individuellement ainsi que pour les mélanges, les premiers effets toxiques observables chez les souris sont une posture voûtée et une léthargie. Ce symptôme est généralement retrouvé à toutes les doses toxiques testées. Aux doses les plus fortes, les mouvements des souris les plus gravement affectées sont caractérisés par un évasement des pattes postérieures, des paralysies, ainsi que des tremblements de l'ensemble du corps. Comme dans les autres études expérimentales, les temps d'apparition des signes cliniques, le délai avant le décès et le délai de récupération observés lors de l'administration par gavage et par alimentation, sont prolongés par rapport à l'administration par voie i.p.

À la dose de 1 270 nmol.kg⁻¹ de STX dans l'étude de Finch *et al.* (2018), une seule souris sur trois du groupe exposé à la STX *via* la nourriture, a présenté au moins l'un des effets toxiques (changement dans la posture, fréquence respiratoire ou mouvements des animaux) investigués. Ces derniers ont été recensés par les auteurs lors de la surveillance des souris de manière continue pendant un intervalle de 3 heures, au cours duquel tout effet toxique est noté. Les auteurs rapportent qu'à la dose de 1 140 nmol.kg⁻¹ aucune souris ne présentait d'effets toxiques tandis qu'à la dose de 1 470 nmol.kg⁻¹ les deux souris testées présentaient l'ensemble des effets toxiques mentionnés ci-dessus. Le NOAEL retenu par les auteurs pour cette voie d'administration, seule voie pour laquelle un NOAEL est défini dans l'étude, est la valeur 1 270 nmol.kg⁻¹.

La toxicité par voie orale, qui reproduit le mode principal d'exposition humaine (Tableau 2), est moins élevée que par injection i.v (Tableau 3). Les administrations de la STX par voie i.v, i.p et intramusculaire (i.m) s'avèrent en effet être les plus toxiques (Tableau 3), puisqu'elles

s'affranchissent du passage de la barrière intestinale. Cependant, elles ne sont pas représentatives d'une exposition naturelle chez l'Homme ou l'animal.

Tableau 2 : Résultats d'études expérimentales de toxicologie aiguë de la STX et de ses variants par différents types de voies orales chez différentes espèces de vertébrés

Voie d'administration	Espèce	Valeur repère (en $\mu\text{mol.kg}^{-1}$)	Toxine	Source	
Gavage	Souris	DL ₅₀ = 1 190	STX	Munday <i>et al.</i> , 2013	
		NOAEL = 0,544			
		DL ₅₀ = 0,700	NéoSTX		
		NOAEL = 0,276			
		DL ₅₀ = 2 600	dcSTX		
		NOAEL = 0,890			
		DL ₅₀ = 1,61	GTX-1 & 4		
		NOAEL = 0,820			
		DL ₅₀ = 2 230	GTX-2 & 3		
		NOAEL = 1 230			
		DL ₅₀ = 1 890	GTX5		Selwood <i>et al.</i> , 2017
		NOAEL = 5,12			
		DL ₅₀ = 31,1	GTX6		
		NOAEL = 7,9			
		DL ₅₀ = 7,13	dcGTX-2 & 3		
		NOAEL = 2,53			
		DL ₅₀ = 5,5	dcnéoSTX		
		NOAEL = 2,13			
		DL ₅₀ = 35	C1 & 2		
		NOAEL = 15			
DL ₅₀ = 42,7	C3 & 4				
NOAEL = 25,5					
		DL ₅₀ = 1 237	STX	Finch <i>et al.</i> , 2018	
Nourriture		DL ₅₀ = 3,20	STX	Munday <i>et al.</i> , 2013	
		DL ₅₀ = 1,26	NéoSTX		
		DL ₅₀ = 8,68	dcSTX		

Voie d'administration	Espèce	Valeur repère (en $\mu\text{mol.kg}^{-1}$)	Toxine	Source
		DL ₅₀ = 3,42	GTX-1 & 4	Selwood <i>et al.</i> , 2017
		DL ₅₀ = 5,59	GTX-2 & 3	
		DL ₅₀ = 50	GTX5	
		NOAEL = 17,1		
		DL ₅₀ > 188	GTX6	
		NOAEL = ND ⁵		
		DL ₅₀ 29,6	dcGTX-2 & 3	
		NOAEL = 10		
		DL ₅₀ = 14,3	dcnéoSTX	
		NOAEL = 4,36		
		DL ₅₀ = 74,0	C1 & 2	
		NOAEL = 17,4		
		DL ₅₀ = ND	C3 & 4	
		NOAEL = ND		
		NOAEL = 1,27	STX	
ND	Souris	DL ₅₀ = 0,011 – 0,028	STX	Wiberg et Stephenson, 1960 ; Cheymol et Toan, 1969
ND	Souris	DL ₅₀ = 0,88	STX	Wiberg et Stephenson, 1960
ND	Rat	DL ₅₀ = 0,64	STX	Cheymol et Toan, 1969
ND	Lapin	DL ₅₀ = 0,60	STX	
ND	Cochon d'Inde	DL ₅₀ = 0,45	STX	
ND	Chien	DL ₅₀ = 0,60	STX	
ND	Chat	DL ₅₀ = 0,84	STX	
ND	Pigeon	DL ₅₀ = 0,30	STX	Cheymol <i>et al.</i> , 1968

⁵ ND : Non déterminé

Tableau 3 : Résultats d'études expérimentales de toxicologie aiguë de la STX et de ses variants par différentes voies intraveineuse, intrapéritonéale, sous-cutanée et intramusculaire chez différentes espèces de vertébrés

Voie d'administration	Espèce	DL ₅₀ (en µmol.kg ⁻¹)	Toxine	Source
Intrapéritonéale	Souris	0,0278	STX	Munday <i>et al.</i> , 2013
		0,0089	NéoSTX	
		0,0354	dcSTX	
		0,0146	GTX-1 & 4	
		0,0367	GTX-2 & 3	
	Souris	0,125	GTX5	Selwood <i>et al.</i> , 2017
		0,227	GTX6	
		0,04	dcGTX-2 & 3	
		0,478	dcnéoSTX	
		0,4	C1 & 2	
		0,48	C3 & 4	
		0,024	STX	
	Rat	0,035	STX	Cheymol et Toan, 1969
Intraveineuse	Souris	0,0278	STX	Munday <i>et al.</i> , 2013
	Lapin	0,013	STX	Cheymol et Toan, 1969
	Poulet	0,010	STX	
Sous-cutanée	Souris	0,043	STX	Davio, 1985
Intramusculaire	Rat	0,023	STX	Kohane <i>et al.</i> , 2000

Le mécanisme de toxicité de la STX et de ses variants, désormais bien documenté et détaillé en partie 3.7, correspond aux symptômes présentés par les diverses espèces animales exposées aux toxines.

3.2.2 Irritation

3.2.2.1 Données chez l'Homme

Lors de la contamination de lacs finlandais par des efflorescences de diverses espèces de cyanobactéries productrices de STX – majoritairement *Anabaena lemmermannii* - plusieurs cas d'intoxication d'enfants âgés de 2 à 10 ans se sont traduits par une irritation cutanée et oculaire. Ces effets toxiques, associés à des signes systémiques tels que des douleurs abdominales et de la fièvre, sont imputés par les auteurs à la STX et ses variants, seules toxines présentes dans les échantillons des lacs concernés (Rapala *et al.*, 2005).

La toxicité cutanée engendrée par la contamination d'eaux récréatives par des cyanobactéries est attribuée aux lipopolysaccharides (LPS), constituants de la paroi cellulaire de l'ensemble des

cyanobactéries. Les LPS, retrouvés en effet chez toutes les bactéries Gram négatives, peuvent provoquer des réactions d'irritation et allergiques dans les tissus humains et animaux (Pilotto *et al.*, 2004). D'autres espèces de cyanobactéries, non productrices de STX, peuvent donc également entraîner une irritation cutanée.

Il existe cependant un manque de connaissances sur l'occurrence et la toxicité des LPS cyanobactériens, combiné à la diversité des structures des LPS dans les cyanobactéries.

Du fait de l'exposition concomitante par voie orale et par voie cutanée lors d'une baignade, les risques liés à cette multi-exposition ne sont pas négligeables.

3.2.2.2 Données chez l'animal

Aucune donnée n'est disponible à ce jour pour la STX et ses variants.

3.2.3 Sensibilisation

3.2.3.1 Données chez l'Homme

Aucune donnée spécifique de la STX et ses variants n'est disponible à ce jour. Toutefois, d'une manière générale, la sensibilité des individus aux cyanobactéries dans les eaux de baignade est très variable, parce qu'il peut s'agir aussi bien de réactions allergiques que de réactions directement induites par les toxines. Les pigments cyanobactériens peuvent par exemple être à l'origine de réactions allergiques (Cohen et Reif, 1953). Les cyanobactéries ont des caractéristiques communes avec les pneumallergènes courants en suspension dans l'air et des études ont montré des réponses allergiques aux cyanobactéries chez des patients souffrant de rhinite et/ou d'asthme allergique. Un cas détaillé récent rapporte l'intoxication d'une jeune fille de 11 ans, hospitalisée pour une réaction allergique se manifestant par un œdème facial grave avec œdème périorbitaire et une éruption cutanée prurigineuse érythémateuse sur les bras et les mains après avoir joué et nagé dans le lac Ontario au parc de « Presque Isle State » (Geh *et al.*, 2016). L'analyse d'un échantillon du sérum de la patiente a montré une augmentation des immunoglobulines E (IgE) spécifiques à l'extrait de cyanobactéries, en excluant d'autres causes sous-jacentes. Cependant, l'identité des espèces de cyanobactéries et des toxines produites demeure incertaine dans l'étude.

3.2.3.2 Données chez l'animal

Aucune donnée n'est disponible à ce jour pour la STX et ses variants.

3.3 Toxicité subchronique et chronique

3.3.1 Données chez l'Homme

Aucune donnée n'est disponible sur la toxicité subchronique/chronique de la STX et ses variants, bien que l'hypothèse d'une exposition humaine à de faibles doses sur des périodes de temps longues soit tout à fait plausible.

3.3.2 Données chez l'animal

S'agissant des données de toxicologie subchronique/chronique, les effets mis en évidence dans les études expérimentales concernent majoritairement la neurotoxicité induite par la STX et ses variants.

3.3.2.1 Neurotoxicité

La consommation répétée par des rats femelles Wistar pendant 30 jours d'eau contaminée par *Cylindrospermopsis raciborskii*, cyanobactérie productrice de STX et de néoSTX, à des concentrations de 3 et 9 µg.L⁻¹ de STX, a montré que l'activité antioxydante totale (« Total Antioxidant Capacity » ou ACAP) est perturbée et est caractérisée par la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO, soit « Reactive Oxygen Species » ou ROS en anglais) associée à une

diminution des défenses antioxydantes (Ramos *et al.*, 2014). En effet, les rattes dont l'eau de boisson a été supplémentée en STX (3 et 9 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) pendant 30 jours ont présenté des modifications de l'ACAP, due à un phénomène adaptatif consécutif à la production d'ERO dans le cerveau, notamment l'hippocampe, et dans le foie (Ramos *et al.*, 2014).

À la concentration de 3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, les rattes testées dans l'étude présentaient une diminution de l'activité de la glutamate cystéine ligase (GCL) dans le cortex ainsi qu'une augmentation de la concentration de glutathion dans le cerveau et le foie. À la concentration la plus élevée testée dans l'étude de Ramos *et al.* (9 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), les rats présentaient une augmentation de l'ACAP dans l'hippocampe ainsi que de l'activité de la GCL et de la glutathion-S-transférase (GST) dans le cortex et l'hippocampe (Ianora *et al.*, 2011).

Aux deux concentrations, une peroxydation lipidique était enregistrée dans le foie malgré un mécanisme adaptatif anti-oxydant. Par conséquent, l'étude conclut que l'ingestion chronique de STX peut altérer les défenses anti-oxydantes dans le foie, sans nécessairement s'accompagner d'un phénomène de stress oxydant à proprement parlé dans le cerveau (Ramos *et al.*, 2014).

À une concentration de 9 μg d'éq-STX.L⁻¹ *via* la consommation d'eau potable contaminée à *C. raciborskii* pendant 30 jours également, l'étude de Diehl *et al.* (2016) a montré que les rats présentaient une diminution des performances de la mémoire, mise en évidence par les tests de l'évitement intérieur (« Inhibitory Avoidance » ou IA) et du labyrinthe aquatique de Morris (« Morris water maze » ou MWM). En effet, les résultats suggèrent un effet amnésiant de la STX sur les mémoires aversives et spatiales des rats. En revanche, le test du MWM n'a pas montré de variation de la vitesse de nage des animaux, n'indiquant pas de dysfonction des muscles squelettiques dans l'étude.

Enfin, l'effet de la STX sur les niveaux d'acides aminés neurotransmetteurs (aspartate, glutamate, GABA) dans le cerveau a été étudié. Une injection i.p de SXT (5 et 10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ p.c) sur de jeunes rats mâles pendant 30 à 120 minutes a produit une augmentation des niveaux d'aspartate et de glutamate dans le cerveau, même si localement, des diminutions des concentrations d'aspartate, glutamate, taurine (tous trois excitateurs) et de GABA (inhibiteur) (Cianca *et al.*, 2009) ont été observées. En outre, l'administration aiguë intrapéritonéale de STX à dose sublétales chez le rat Sprague-Dawley a également montré une altération aiguë de la production de dopamine (DA) et de son métabolite, l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique (DOPAC) (Cianca *et al.*, 2011).

La STX perturbe donc l'homéostasie de certaines voies de neurotransmission centrales. D'autre part, étant donné que l'excitabilité neuronale joue un rôle important dans le développement normal du SNC, une exposition prolongée aux PST peut affecter la neurogenèse (Brackenbury *et al.*, 2010).

3.3.2.2 Autres effets toxiques

Une diminution transitoire du poids corporel et de la consommation de nourriture après administration répétée (12 semaines) par voie sous-cutanée de 6 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de néoSTX est observée chez le rat Sprague Dawley (Zepeda *et al.*, 2014). À cette dose, l'étude met également en évidence une cholestase à la fin de la période de traitement, suivie d'un retour à la normale après cette période. À des doses plus faibles de 1 à 3 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, aucun effet significatif n'est rapporté dans l'étude par rapport au groupe contrôle.

3.4 Effets sur la reproduction et le développement

3.4.1 Données chez l'Homme

Aucune étude sur la toxicité potentielle sur la reproduction et le développement chez l'Homme n'est disponible à ce jour pour la SXT et ses variants.

3.4.2 Données chez l'animal

Aucune étude sur la toxicité potentielle sur la reproduction et le développement chez l'animal n'est disponible à ce jour pour la SXT et ses variants. Cependant, deux études ont évalué l'impact de la

STX sur le développement du poisson-zèbre : dans chacune, la STX a été ajoutée au milieu, à des concentrations plus élevées que celles auxquelles une personne est susceptible d'être exposée sur une longue période (Oberemm *et al.*, 1999 ; Lefebvre *et al.*, 2004). En conséquence, il est toutefois difficile d'extrapoler à l'Homme ces données expérimentales. L'exposition de larves de poissons-zèbres à la STX (229 µg éq-STX.L⁻¹) pendant 7 jours a induit une diminution des fonctions sensorimotrices dès 48 heures et une paralysie après 4 jours. À une dose 2 fois supérieure (481 µg éq-STX.L⁻¹), la toxine a entraîné un œdème au niveau de plusieurs organes (œil, péricarde, sac vitellin). Enfin une paralysie des larves, dont l'intensité dépend du stade de développement, a été constatée. L'étude note que ces effets morphologiques et sensorimoteurs sublétaux étaient réversibles si ces larves étaient ensuite placées dans une eau exempte de toute toxine. Les poissons-zèbres exposés transitoirement à la STX au cours du développement larvaire (2 à 4 jours après fertilisation) avaient une croissance et une survie réduites (Lefebvre *et al.*, 2004). Des résultats comparables avaient été générés sur le même modèle, à des concentrations de 10 à 500 µg.L⁻¹ de STX (Oberemm *et al.*, 1999).

3.5 Génotoxicité

Il n'existe que très peu d'études de la génotoxicité de la STX et de ses variants. L'étude de Melegari *et al.* (2015) s'est intéressée au potentiel cytotoxique et génotoxique de la STX, en examinant ses effets sur deux lignées cellulaires de mammifères : la lignée Neuro 2A (N2A), une lignée cellulaire de neuroblastome de souris et la lignée cellulaire Vero, dérivée de cellules rénales de singe vert Vero. Ces deux lignées ont été exposées à plusieurs concentrations de STX allant de 0,5 à 64 nanomoles (nM) pour déterminer la viabilité cellulaire, l'induction de l'apoptose (test de fragmentation d'ADN) et la formation de micronoyaux (MN) (« cytokinesis-block micronucleus test » ou CBMN) après 24 heures d'incubation. Les résultats de cette étude n'ont démontré aucun changement significatif dans la fréquence des cellules binucléées présentant des MN dans les cellules N2A et Vero exposées à la STX, indiquant l'absence de génotoxicité dans ces conditions d'essai (Melegari *et al.*, 2015).

À l'inverse, des effets génotoxiques ont été mis en évidence sur le poisson dulcicole *Hoplias malabaricus* (Da Silva *et al.*, 2011). Ce travail a évalué les effets d'une injection intrapéritonéale d'un extrait de *C. raciborskii* (0,08 µg/100 g) produisant de la STX, après 20 jours, sur le cerveau. Des dosages d'activités enzymatiques caractéristiques ont été réalisés, montrant une augmentation de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD). Réciproquement, l'activité d'autres enzymes (catalase (CAT), GST et glutathion peroxydase (GPx)) a diminué. Le test des comètes a montré des effets génotoxiques des extraits contenant des cyanobactéries productrices de STX. Ces résultats issus d'échantillons collectés de cerveau des poissons, traduisent des effets délétères sur l'ADN, les protéines et les lipides, *via* un mécanisme pro-apoptotique.

L'étude de Da Silva *et al.* (2014), a confirmé ces derniers résultats en exposant des cellules neuronales de *H. malabaricus* à une concentration de 3 µg L⁻¹ d'éq-STX. En effet, lors de cette exposition, le test des comètes a montré une augmentation du nombre de dommages à l'ADN (Da Silva *et al.*, 2014).

3.6 Cancérogénicité

La STX n'a pas encore été étudiée quant à son caractère cancérogène par le Centre International de recherche sur le cancer (CIRC). Ceci est dû, selon le CES, à un profond manque de données dans la littérature scientifique, qui ne permet pas de déterminer le potentiel cancérogène de la STX.

3.7 Mécanismes d'action

La STX et ses variants sont de puissantes neurotoxines inhibitrices des canaux Na_v des cellules neuronales et musculaires, ainsi que - à des concentrations supérieures - des canaux calcium voltage-dépendants (Ca_v) (Hackett *et al.*, 2013) et potassium voltage-dépendants (K_v) (Kvitek et Bretz, 2004) des cellules excitables (neurones, myocytes cardiaques, fibres musculaires

squelettiques et lisses) (Kao 1993). Le blocage des canaux Na_v empêche la dépolarisation membranaire et ainsi (i) la propagation de l'influx nerveux dans les nerfs périphériques et (ii) la contraction des muscles squelettiques (Su *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2003). La STX affecte principalement le SNP mais peut, selon les doses d'exposition, avoir des conséquences sur la chronotropie et la dromotropie cardiaque (Gad, 2014). Ce blocage de la communication neuronale ainsi que des jonctions neuromusculaires aboutit à une paralysie musculaire et respiratoire chez les mammifères. Cette intoxication se manifeste par des signes neurologiques centraux typiques tels que l'ataxie et des convulsions ainsi que des signes périphériques tels qu'une détresse respiratoire et une paralysie musculaire entraînant la mort en quelques minutes (Testai *et al.*, 2016), d'où le terme de « paralytic shellfish toxin » (PST) (Narahashi, 1972 ; Kao, 1993). Ce mécanisme de toxicité, commun avec la TTX, est à lui seul capable de rendre compte de l'ensemble des symptômes observés chez l'Homme et expérimentalement chez les animaux de laboratoire.

3.7.1 Inhibition des canaux Na_v

Les canaux Na_v sont des protéines membranaires exprimées dans le système nerveux central (SNC) et le SNP, la musculature squelettique et lisse et le système cardiovasculaire. Ils assurent les flux transmembranaires passifs d'ions Na^+ , selon le gradient électrochimique, à savoir du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire. Dans les cellules excitables, ils sont responsables de la phase ascendante du potentiel d'action, c'est-à-dire la phase de dépolarisation (Eijkelkamp *et al.*, 2012). Ils sont également exprimés dans des cellules non excitables (cellules gliales, endothéliales, tumorales) où leur fonction est peu caractérisée. Il existe neuf sous-types de canaux Na_v , inégalement exprimés dans l'organisme : on les note $\text{Na}_v1.1$ à $\text{Na}_v1.9$ (Eijkelkamp *et al.*, 2012). Le canal ionique est formé d'une sous-unité alpha (α) contenant le pore membranaire, et d'une (ou deux) sous-unités beta (β).

La sous-unité α du canal est constituée de 4 domaines homologues, numérotés de I à IV, reliés entre eux par trois boucles cytoplasmiques également appelées « linker » (L1, L2 et L3). Chaque domaine est formé de 6 segments transmembranaires, S1 à S6, liés par de petites boucles intracellulaires et extracellulaires. Les 4 boucles extra-cellulaires, appelées boucle « P » (pour « permeation loops ») relient les segments S5 et S6 transmembranaires de chaque domaine et forment la partie extracellulaire du canal ionique (Cervenka *et al.*, 2010). Chacune de ces boucles P contient deux acides aminés spécifiques, et se replie dans le pore du canal, formant ainsi le filtre de sélectivité du canal Na_v (Figure 3-A).

Le pore, qui conduit les ions Na^+ , représente l'ensemble des segments S5 et S6 et des boucles P (Yu *et al.*, 2005).

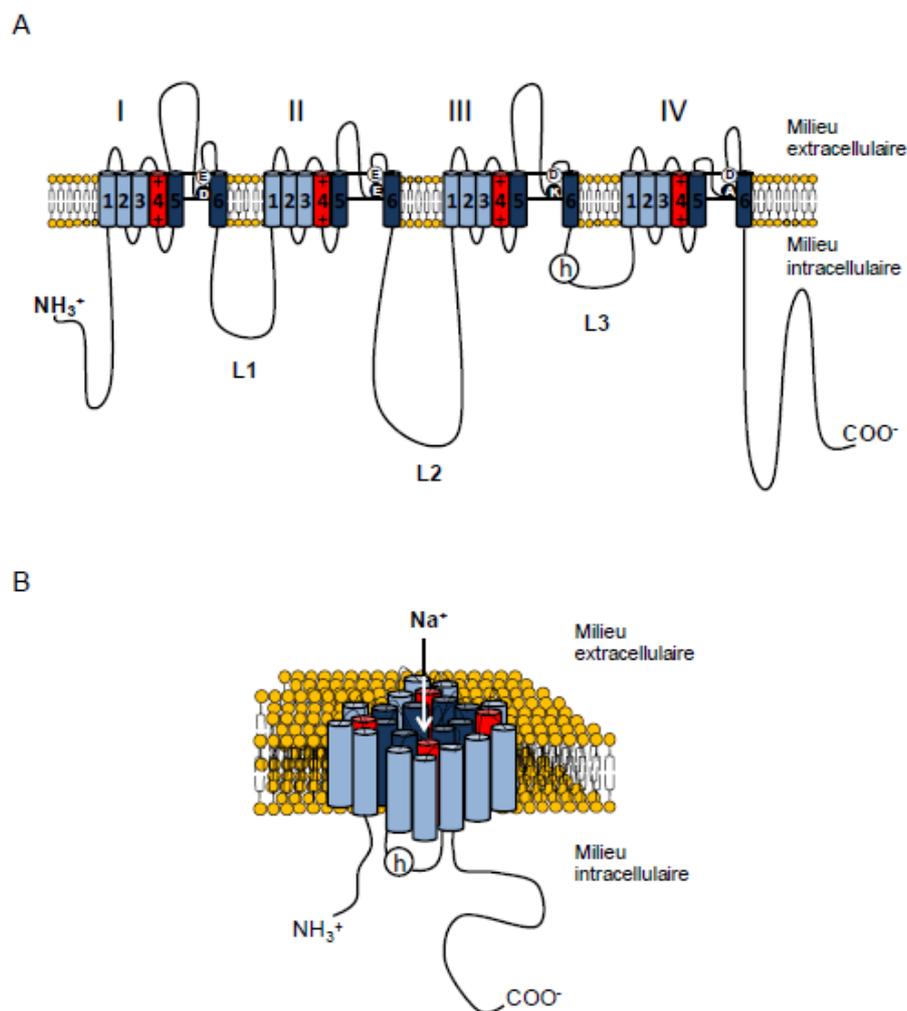


Figure 3 : Relation structure-fonction du Na_v (Bourdin 2013)

De nombreuses molécules toxiques ciblent le canal Na_v (au niveau de la sous-unité α) et en modifient les propriétés biophysiques, aboutissant à une activation ou une inhibition du canal (Ahern *et al.*, 2016 ; Duran-Riveroll *et al.*, 2016). La STX, de poids moléculaire d'environ 300 Da (Shen *et al.*, 2018), fait partie de ces molécules. Elle possède une forte affinité pour le site 1 du canal Na_v et inhibe sa perméabilité aux ions Na⁺ en obturant le pore du canal (Ritchie et Rogart, 1977 ; Kao *et al.*, 1983). Cette affinité de la STX pour le filtre de sélectivité des canaux Na_v est due à la polarité de la toxine grâce à ses résidus chargés.

La STX et ses variants interagissent en effet avec les acides aminés formant les bords du pore et jouent le rôle de bouchon physique en obturant de manière sélective et réversible (Thottumkara *et al.*, 2014 ; Zepeda *et al.*, 2014) l'extérieur du canal ce qui empêche les ions Na⁺ d'accéder au canal et bloque donc les courants d'ions Na⁺ (Figure 3-B) (Shen *et al.*, 2018). L'inhibition des canaux Na_v interrompt la communication neuronale et la contractilité musculaire par blocage du potentiel d'action. La STX et la TTX ont des affinités différentes en fonction des sous-types de canaux Na_v : elles exercent leur activité inhibitrice pour des concentrations de l'ordre du nM vis-à-vis des sous-types Na_v1.1-1.4, 1.6, 1.7 (Cl₅₀ de 4 à 25 nM), et pour des concentrations en μ M pour les sous-types Na_v1.5, 1.8, 1.9 (Cl₅₀ de 5,7 à 60 μ M) (Rogart, 1981). Par suite, le blocage de ce potentiel d'action inhibe la libération de l'acétylcholine (ACh) des motoneurones cholinergiques.

Cette affinité pour des sites moléculaires bien précis des canaux Na_v a également été démontrée par une étude de substitution d'acides aminés par mutagenèse chez le rat (Noda *et al.*, 1989). En effet, la substitution d'un résidu d'acide glutamique, situé dans la boucle P du domaine I des canaux

Na_v1.2 chez les rats mutés en un résidu glutamine (E386Q) empêche la STX et la TTX de se fixer aux canaux. Ces canaux deviennent donc ainsi résistants à la STX et la TTX, même à des concentrations supérieures à 10 µM. Sans mutation de ces sites moléculaires, l'effet de la STX et ses variants est létal lorsqu'ils parviennent aux fibres musculaires squelettiques des voies respiratoires.

En plus de cet effet sur les canaux Na_v, la STX peut également cibler les canaux Ca_v et K_v. Elle peut être séquestrée par des protéines circulantes, notamment de type « transferin-like » (Llewellyn *et al.*, 1997 ; Yotsu-Yamashita *et al.*, 2001).

3.7.2 Inhibition des canaux Ca_v

Les études s'intéressant à l'impact de la STX sur les canaux Ca_v (Hackett *et al.*, 2013) sont beaucoup moins nombreuses que celles relatives à l'inhibition des canaux Na_v. Ceci étant, la STX fut reconnue dès les années 1980 comme potentiel inhibiteur des courants calciques des canaux Ca_v (Jones et Marks, 1989). Les canaux Ca_v sont structurellement organisés comme les canaux Na_v. À l'instar des canaux Na_v, il existe différents sous-types de canaux Ca_v, exprimés de manière différentielle dans les tissus biologiques : les canaux de types L (contraction musculaire), N, P et Q (libération de neurotransmetteurs), R (excitabilité neuronale) et T (régulation de la fréquence des potentiels d'action). Ces sous-types, outre les fonctions auxquelles ils sont associés, se différencient par leurs propriétés biophysiques et leur sensibilité à différentes molécules toxiques (Heinemann *et al.*, 1992). La STX, à des concentrations de l'ordre du micromolaire (µM), bloque partiellement les canaux Ca_v myocardiques de type L, et agirait sur d'autres propriétés biophysiques du canal, perturbant ainsi le flux d'ions Ca²⁺ (Su *et al.*, 2004).

3.7.3 Inhibition des canaux K_v

L'impact de la STX et de ses variants sur les canaux K_v est comme pour les canaux Ca_v très peu détaillée dans la littérature scientifique.

Les canaux K_v sont une famille hétérogène de protéines membranaires assurant les flux d'ions potassium (K⁺). À des concentrations de l'ordre du micromolaire, la STX cible le canal hERG (« human Ether-a-go-go-Related Gene ») qui contribue à la phase de repolarisation des cellules cardiaques et modifie ainsi l'activité du canal, plutôt que de le bloquer comme un inhibiteur classique. La toxine déstabilise l'état inactivé et stabilise l'état fermé. Les canaux hERG liés à la toxine nécessitent une plus forte dépolarisation transmembranaire pour parvenir à l'ouverture du canal, ce qui en réduit la conductance potassique globale (Wang *et al.*, 2003).

3.8 Populations à risque

D'après une étude de cas relative à une épidémie d'intoxication par des mollusques (*Amphichaena kindermani*) entre juillet et août 1987, sur la côte pacifique du Guatemala, les enfants semblent être la population la plus sensible. Sur les 187 personnes intoxiquées dans cette étude et présentant des symptômes, les enfants de moins de 6 ans avaient un taux de mortalité plus élevé (50%) que les personnes de plus de 18 ans (7%).

La DL minimale pour un enfant de 25 kg est estimée à 3 493 µg soit 140 µg.kg⁻¹ p.c. ; alors que dans cette étude quatre autres patients décédés n'ont mangé qu'un seul plat à base de palourdes (30 à 85 g de chair). En utilisant l'estimation HPLC de 7 500 µg de STX / 100 g de chair, la DL calculée pour ces patients est de : 11 000 à 35 000 µg soit 480 à 4 375 µg.kg⁻¹ p.c. Les enfants de moins de 6 ans semblent donc être plus sensibles aux PST que les adultes. Par ailleurs, l'étude relate que le taux d'attaque⁶ le plus élevé concerne en revanche la population des 13 – 17 ans (33,3/1000) (Rodrigue *et al.*, 1990).

⁶ Le taux d'attaque est un indicateur épidémiologique représentant l'incidence des nouveaux cas au cours d'une épidémie dans une population donnée au cours d'une période définie.

4 Élaboration de la valeur toxicologique de référence

4.1 VTR

4.1.1 VTR aiguës par voie orale

La diversité d'études a conduit les experts du « Panel on Contaminants in the Food Chain » de l'EFSA à évaluer la toxicité de la STX et de ses variants, ce qui leur a permis de déterminer en 2009 une « acute reference Dose » (ARfD) de 0,5 µg.kg⁻¹ p.c d'équivalent de STX (noté µg éq-STX.kg⁻¹ p.c), sur la base de 14 études recensant plus de 500 cas d'intoxications humaines. Pour obtenir cette valeur, les experts du comité de l'EFSA ont conclu à un LOAEL de 1,5 µg éq-STX.kg⁻¹ p.c sur la base d'un ensemble de symptômes qualifiés de « bénins » dans le rapport de l'EFSA. Ces symptômes sont les suivants : sensation de picotement ou d'engourdissement autour des lèvres se propageant progressivement jusqu'au visage et au cou, sensation de picotement au bout des doigts et des orteils, maux de tête, vertiges et nausées. Les diverses études utilisées par l'EFSA mettent en évidence que les niveaux d'exposition sont hétérogènes car ces derniers sont compris entre 0,3 et 2 058 µg éq-STX.kg⁻¹ p.c pour les valeurs les plus extrêmes (Gessner et Middaugh, 1995). Cet ARfD a été calculée car l'EFSA estimait qu'il n'était pas possible de définir une « tolerable daily intake » (TDI) ou « dose journalière admissible » (DJA). S'agissant des facteurs d'incertitude appliqués, l'EFSA s'est affranchie de la variabilité inter-espèces (UF_A) et de la variabilité inter-individuelle (UF_H) du fait de la nature des études et du nombre d'individus exposés et a donc retenu un facteur d'incertitude global de 3 pour prendre en compte l'utilisation d'un LOAEL (EFSA 2009).

En l'absence de critères fédéraux sur les cyanotoxines dans les eaux de baignade, l'« Oregon Health Authority » (Kohane *et al.*, 2000) a défini des valeurs indicatives pour les cyanotoxines les plus courantes dans les eaux douces de l'Oregon. S'agissant de la STX, l'OHA s'est basée sur l'ARfD de l'EFSA publiée en 2009, estimant que cette ARfD représente un NOAEL. L'OHA a ensuite appliqué un facteur de 10 à cause du nombre de données limité dans la base utilisée (UF_D). Concernant les autres facteurs d'incertitudes, l'OHA n'a pas non plus appliqué de facteur d'incertitude à la variabilité individuelle, car la méta-analyse de l'EFSA couvrait la population générale comprenant des individus sensibles.

Tableau 4 : Recensement des valeurs toxicologiques de références par voie orale pour la STX

Organisme (année)	Effet critique Étude source	Dose critique	UF	VTR
EFSA (2009)	Ensemble des symptômes qualifiés comme « bénins » selon l'EFSA, à savoir : sensation de picotement ou d'engourdissement autour des lèvres se propageant progressivement jusqu'au visage et au cou, sensation de picotement au bout des doigts et des orteils, maux de tête, vertiges et nausées (Meyer, 1953 ; Tennant, Naubert et Corbeil, 1955 ; Seven, 1958 ; McCollum <i>et al.</i> , 1968 ; Prakash, 1971 ; Popkiss, Horstman et Harpur, 1979 ; Langeland <i>et al.</i> , 1984 ; Rodrigue <i>et al.</i> , 1990 ; Kuiper-Goodman et Todd, 1991 ; Sharifzadeh <i>et al.</i> , 1990 ; Gessner et Middaugh, 1995 ; Gessner <i>et al.</i> , 1997 ; Garcia <i>et al.</i> , 2004 ; Garcia <i>et al.</i> , 2005)	LOAEL = 1,5 µg éq-STX.kg ⁻¹ p.c	3 UF _A = 1 UF _H = 1 UF _{B/L} = 3 UF _S = 1 UF _D = 1	ARfD = 0,5 µg éq-STX.kg ⁻¹ p.c

	Études épidémiologiques, exposition par consommation de mollusques			
<i>Oregon Health Authority</i> (2019)	Ensemble des symptômes qualifiés comme « bénins » selon l'EFSA, à savoir : sensation de picotement ou d'engourdissement autour des lèvres se propageant progressivement jusqu'au visage et au cou, sensation de picotement au bout des doigts et des orteils, maux de tête, vertiges et nausées	NOAEL = ARfD _{EFSA} = 0,5 µg éq-STX.kg ⁻¹ p.c Considérée comme un NOAEL par l'OHA Mêmes effets critiques que l'EFSA	10 UF _A = 1 UF _H = 1 UF _{B/L} = 1 UF _S = 1 UF _D = 10	TDI provisoire = 0,05 µg éq-STX.kg ⁻¹ p.c
	EFSA 2009			

4.1.2 VTR subchroniques par voie orale

Aucune VTR subchronique par voie orale n'a été construite à ce jour pour la STX.

4.1.3 VTR chroniques par voie orale

4.1.3.1 VTR à seuil

Aucune VTR chronique par voie orale n'a été construite à ce jour pour la STX.

4.1.3.2 VTR sans seuil

Aucune VTR sans seuil pour les effets cancérogènes par voie orale n'a été construite à ce jour pour la STX.

4.2 Valeurs guide dans l'eau

Plusieurs valeurs guides ont été établies au cours des dernières années (Tableau 5). La majeure partie de ces valeurs concernent des valeurs guides pour les EDCH, tandis que les autres concernent les eaux récréatives. La plupart de ces valeurs guides est issue de la valeur de l'ARfD de 0,5 µg éq-STX.kg⁻¹ p.c définie par l'EFSA en 2009.

Pour l'Union européenne, la directive 91/492/EEC fixe la limite de contamination par les PSP dans les parties comestibles des mollusques (corps entier ou toute partie consommable séparément), à 80 µg pour 100 g, d'après le test du MBA.

Certains pays proposent des limites spécifiques pour protéger les personnes contre les expositions dangereuses aux STX *via* les EDCH, par exemple, une limite de 3 µg.L⁻¹ d'éq-STX a été fixée en Australie, en Nouvelle-Zélande et au Brésil. En Oregon, les valeurs de 0,3 et 1,6 µg éq-STX.L⁻¹ en tant que limites de contamination des EDCH ont été déterminées en 2018.

Or, comme l'a montré l'étude de Ramos *et al.* (2014), une concentration dans les EDCH de 3 µg.L⁻¹ peut être à l'origine chez le rat de l'altération des mécanismes de défenses antioxydants et induire un phénomène adaptatif dans au moins deux organes étudiés dans l'étude : le cerveau et le foie, *via* la production d'ERO. Ces altérations pouvant entraîner des effets délétères sur les macromolécules telles que les lipides et pouvant augmenter la vulnérabilité de l'hippocampe, la valeur guide de 3 µg.L⁻¹ devrait être révisée.

En 2019, l'OHA a fixé par le biais de l'« Oregon Harmful Algae Bloom Surveillance Program » (HABS) une limite de contamination de 8 µg.L⁻¹ pour les eaux récréatives, venant modifier la valeur de 4 µg.L⁻¹ établie en 2018. Cette valeur est par ailleurs en opposition avec la valeur de 75 µg.L⁻¹ de STX-éq fixée par le « Washington State Department of Health » en 2011. La différence entre ces deux valeurs s'explique par la différence de poids corporels, de quantités d'eau présumée être

ingérée lors de la baignade, et la différence entre le TDI de $0,05 \mu\text{g éq-STX. kg p.c. j}^{-1}$ et l'ARfD de $0,5 \mu\text{g éq-STX.kg p.c. j}^{-1}$ utilisés respectivement par l'OHA et l'État de Washington dans les calculs.

Tableau 5 : Recueil des valeurs de références disponibles.

Pays/Région	Union européenne	Nouvelle Zélande	Australie	Brésil	Ohio	Oregon			Washington
Population cible	Toute population	Toute population	Toute population	Toute population	Toute population	Adultes	Enfants < à 5 ans)	Toute population	Toute population
Type de VTR (aiguë, subchronique, chronique seuil/sans seuil)	Consommation de crustacés	<i>Maximum acceptable value (MAV) in drinking water</i>	<i>"Health Alert level"</i>	<i>Recommended Drinking Water Standard</i>	<i>Drinking water guideline value</i>	<i>Cyanotoxin Advisory Values (Szentandrássy et al., 2011) for Drinking Water</i>		<i>Recreation Use Values (RUVs)</i>	<i>(Provisional) recreational guidance value</i>
Durées d'exposition	Aiguë	<i>Daily intake</i>	<i>Daily intake</i>	<i>Daily intake</i>	Aiguë	10 jours	10 jours	Aiguë	Aiguë
Valeur VTR	80 µg éq-STX/100g	3 µg éq-STX.L ⁻¹	3 µg éq-STX.L ⁻¹	3 µg éq-STX.L ⁻¹	0,2 µg éq-STX.L ⁻¹	1,6 µg éq-STX.L ⁻¹	0,3 µg éq-STX.L ⁻¹	8 µg éq-STX.L ⁻¹	75 µg éq-STX.L ⁻¹
Type d'exposition	Consommation de crustacés	EDCH	EDCH	EDCH	EDCH	EDCH		Ingestion accidentelle d'eau de baignade	Eaux récréatives
Voie d'exposition	Orale								
Source	Directive (CE) 91/492/EEC ⁷	New Zealand Ministry of Health 2018	Australian Government 2011	Brazilian Ministry of Health 2011	Ohio EPA 2015	Oregon Health Authority 2018	Oregon Health Authority 2019	Washington State Department of Health 2011	

⁷ Directive 91/492/CEE du Conseil, du 15 juillet 1991, fixant les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché de mollusques bivalves vivants

5 Proposition de VTR aiguë par voie orale

5.1 Choix de l'effet critique

Comme vu précédemment, les premiers effets qui apparaissent aux plus faibles doses chez l'Homme après une intoxication par la STX ou ses variants sont des paresthésies buccales, engourdissements autour des lèvres, étourdissements, céphalées, nausées, vomissements ainsi que des vertiges. Ces symptômes sont suivis d'asthénie, de faiblesse musculaire et de discours incohérents. Lors d'une intoxication, ces symptômes évoluent rapidement vers des paralysies musculaires, des difficultés respiratoires sévères, qui peuvent conduire jusqu'au décès (Arnich et Thébault, 2018).

Selon l'EFSA, le principal effet toxique de la STX et de ses variants est la neurotoxicité. La liaison aux canaux Na_v et le blocage de leur conductance sont considérés comme le principal mécanisme moléculaire de leur neurotoxicité. En outre, l'EFSA rappelle également que cette neurotoxicité due au blocage des canaux Na_v se caractérise par des symptômes de gravité croissante allant de légères paresthésies péri-buccales à un manque de coordination et à une faiblesse générale incohérente de la parole, à une paralysie musculaire et à des difficultés respiratoires.

D'après les études expérimentales disponibles, les effets apparaissant aux doses testées les plus faibles lors d'une exposition aiguë par voie orale à la STX chez le rongeur se manifestent par une respiration abdominale, une léthargie, et la diminution du comportement exploratoire des animaux (Munday *et al.*, 2013).

L'évaluation quantitative à des doses sublétales de la diminution de la force de préhension (« grip strength ») dans l'étude de Munday *et al.* (2013) a permis de compléter les observations qualitatives des symptômes chez les animaux après l'exposition à la STX. Toutefois, le CES VSR regrette que d'autres tests de neurotoxicité n'aient pas été utilisés.

Le mécanisme de toxicité de la STX et de ses variants est désormais bien connu, grâce aux études épidémiologiques et expérimentales. En se basant majoritairement sur des observations visuelles, il peut être conclu que la neurotoxicité engendrée par la STX et ses variants est caractérisée en premier lieu par des signes tels que des paresthésies, évoluant rapidement vers des signes de neurotoxicité plus marqués tels qu'une faiblesse musculaire généralisée.

Comme ces études le montrent, le délai entre l'exposition et l'apparition des premiers symptômes peut survenir chez l'Homme dès les premières minutes après l'ingestion de mollusques contaminés (Gessner *et al.*, 1997) jusqu'à environ 8-9 heures après l'exposition (Knaack *et al.*, 2016).

Du fait de ce mécanisme de toxicité décrit dans les études expérimentales, au cours duquel les signes de dysfonctions neurologiques bénins apparaissent rapidement après ingestion et peuvent évoluer de manière rapide vers des troubles graves pouvant mener au décès, le choix d'un effet critique est délicat. En effet, le blocage des canaux Na_v inhibe l'excitabilité des muscles squelettiques dans différentes parties du corps, et est susceptible de mener au décès d'un individu par arrêt respiratoire en quelques minutes.

Même si le mécanisme de toxicité de la STX est bien documenté, il existe cependant un certain nombre de facteurs non contrôlés dans les études épidémiologiques disponibles, utilisées entre autres en 2009 par l'EFSA pour ses travaux. Ces facteurs influencent par exemple la valeur estimée de l'exposition des personnes intoxiquées, impliquant une incertitude élevée pour l'exposition. Premièrement, la majeure partie des études épidémiologiques utilise le MBA pour estimer la quantité de toxine ingérée par les individus. Or, même si ce test était jusqu'au 1^{er} janvier 2019 la méthode de référence validée par l'AOAC, cette dernière comporte de nombreux biais. Les quantités de toxines présentes dans les mollusques réellement ingérés par les individus exposés ne peuvent pas être connues, du fait de l'utilisation d'autres mollusques comme proxy pour l'estimation des expositions. D'autre part, en plus de son inconvénient bioéthique, le test de MBA met en évidence des

corrélations approximatives entre les doses et le temps avant le décès des animaux. En outre, les résultats du MBA (exprimés en μ), dépendent de la souche de souris utilisée pour le test. S'agissant de ce test, le CES VSR note que dans les années à venir, de nouvelles publications utilisant les techniques chromatographiques et non le MBA, permettront d'utiliser la méthodologie utilisée par Arnich et Thébaud sur des études où l'incertitude de l'exposition serait moins grande (Turner *et al.*, 2019).

Du fait de ces incertitudes relevées dans les études épidémiologiques, leur utilisation comme point de départ pour l'élaboration d'une VTR spécifique de la STX ne semble pas judicieuse. Du fait des incertitudes liées aux données épidémiologiques, le CES VSR propose de ne pas retenir les paresthésies observées chez l'Homme dans certains cas d'intoxications non bénignes, comme effet critique.

Le CES propose de retenir comme effet critique la dysfonction des muscles squelettiques engendrée par le blocage des canaux Na_v , observée dans les études expérimentales. Il attire l'attention sur la difficulté d'établir une relation dose-effet quant à la toxicité de la STX et de ses variants, du fait de leur mécanisme de toxicité.

5.2 Analyse des VTR existantes

Compte tenu des limites des études épidémiologiques, liées notamment à la difficulté de caractériser précisément les expositions des individus intoxiqués, il est décidé par le CES de ne pas retenir les études épidémiologiques disponibles pour l'élaboration d'une VTR ni l'ARfD de $0,5 \mu\text{g éq-STX.kg p.c. j}^{-1}$ établie par l'EFSA en 2009.

Ainsi, le CES propose de construire une nouvelle VTR aiguë par voie orale basée sur une étude expérimentale.

5.3 Construction de VTR

5.3.1 Choix de l'étude-clé

Les études épidémiologiques présentant divers biais, le CES propose la détermination d'une VTR sur la base de l'une des études expérimentales disponibles. Trois études expérimentales ont été sélectionnées par le CES VSR car ces dernières constituent les études les plus récentes et adaptées à l'élaboration d'une VTR. Ce sont les études de Munday *et al.* (2013), Selwood *et al.* (2017) et Finch *et al.* (2018), détaillées précédemment.

Peu de différences existent entre ces études, réalisées par la même équipe de chercheurs. Néanmoins, **l'étude de Munday *et al.* (2013) a été choisie comme étude-clé** car elle est la seule à compléter l'étude des effets toxiques de la STX par le test de préhension, qui permet d'objectiver les résultats de l'observation visuelle de 14 jours effectuée dans les trois études.

En outre, l'étude de Selwood *et al.* (2017), ayant pour objectif de déterminer la toxicité aiguë des variants de la STX en vue de les comparer avec celle de la STX, reprend le NOAEL de l'étude de Munday *et al.* (2013) de 544 nmol.kg^{-1} par gavage dans son tableau de résultats. Ceci incite à utiliser directement l'étude source ayant déterminé ce NOAEL.

5.3.2 Choix de la dose critique

Le CES VSR souligne la difficulté de déterminer une dose critique du fait de l'absence de relation dose-effet claire dans l'étude-clé retenue, et de ce fait la difficulté de modéliser une « Benchmark Dose » (BMD). L'étude de Munday *et al.* (2013), retenue comme étude-clé est comme les études autres expérimentales disponibles, davantage axée sur les DL_{50} que sur la détermination d'un NOAEL ou d'un LOAEL. L'étude, réalisée sur des souris, ne détaille pas les troubles comportementaux des animaux tels que les troubles de l'activité exploratoire. Les indicateurs les plus sensibles des effets sublétaux de la STX, de la néoSTX, dcSTX, GTX-1&4 et GTX-2&3 rapportés dans l'étude sont la respiration abdominale, la léthargie, ainsi que la diminution du

comportement exploratoire non détaillée. Une diminution de la force de préhension est observée uniquement à des doses légèrement inférieures à la DL₅₀ au cours du test de préhension, et constitue le seul effet toxique objectivé. Le CES regrette que cet effet toxique ne soit pas davantage détaillé dans l'étude.

Les doses par gavage pour lesquelles aucun effet n'a été observé se situaient entre 34 et 55% de la DL₅₀ par cette voie.

Comme mentionné précédemment, dans cette étude un NOAEL de 544 nmol.kg⁻¹ est rapporté pour la STX lors d'une administration par gavage tandis qu'un NOAEL de 276 nmol.kg⁻¹ est rapporté pour la néoSTX. Or, il convient de noter que lors d'une exposition à la STX et ses variants, la STX est d'une manière générale retrouvée en quantité minoritaire dans les mélanges de PST (Soto-Liebe *et al.*, 2010). Ces derniers peuvent en effet contenir une part majoritaire de néoSTX.

Malgré l'absence de relation dose-effet observable dans cette étude et le faible niveau de détails des symptômes survenant avant la mort, le NOAEL de 544 nmol.kg⁻¹ peut être considéré comme un point de départ pour l'élaboration d'une VTR. Toutefois, le CES insiste sur l'intervalle de dose très étroit entre le NOAEL observé et les DL₅₀ décrites dans l'étude. Cet intervalle étroit, amène le CES à mettre en garde sur la gravité des intoxications possibles si la VTR élaborée est dépassée. L'étude de Testai *et al.* (2016) met d'ailleurs en évidence que la pente des relations dose-effet pour les effets aigus chez l'humain et chez l'animal est relativement abrupte, ce qui indique qu'il faut faire preuve de prudence à des niveaux d'exposition proches du NOAEL.

Le CES souligne que pour pallier l'absence d'information sur l'intervalle entre le NOAEL et le LOAEL dans l'étude-clé retenue, il serait judicieux de réaliser une étude en multipliant les doses d'exposition sur un intervalle de doses rapprochées, afin de pouvoir mieux caractériser une relation effet-dose. Une étude robuste, réalisée *via* une voie d'administration représentative telle que l'exposition par eau de boisson, pourrait permettre de modéliser la pente correspondant à la relation dose-effet et d'en apprécier l'intensité. Au vu de la difficulté à quantifier les effets observés, ladite étude devrait prévoir de réaliser les tests de neurotoxicité les plus appropriés.

Il est également notable que du fait de l'administration i.p réalisée au cours du MBA dans certaines études expérimentales, la toxicocinétique des PST ne peut pas être mise en évidence car ce type d'administration permet aux toxines administrées de s'affranchir des étapes d'absorption et de distribution. Cette voie d'administration est par ailleurs peu représentative de l'exposition humaine (Testai *et al.*, 2016).

Les experts du CES proposent de considérer le NOAEL décrit dans l'étude Munday *et al.* (2013) comme le seuil *en deçà* duquel il n'est pas attendu de blocage suffisant des canaux Na_v à même d'induire une paralysie musculaire observable chez les animaux exposés. Aussi, **la dose critique retenue correspond au NOAEL observé par gavage, de 544 nmol.kg⁻¹, soit 163 µg.kg⁻¹.**

5.3.3 Ajustement allométrique

Pour spécifier la valeur de l'incertitude sur la variabilité inter-espèce, un ajustement allométrique a été réalisé. Une dose équivalente humaine (« Human Equivalent Dose » soit HED) est calculée à l'aide de l'équation suivante⁸ :

$$\text{Dose équivalente Homme} = \text{Dose animal} \times \left(\frac{\text{Poids animal}}{\text{Poids homme}} \right)^{1/4}$$

Un poids des souris de 22 g a été utilisé pour le calcul, basé sur l'intervalle des poids de souris renseigné dans l'étude (18 – 22g) et afin de davantage concorder avec la préconisation de l'US EPA (US EPA, 2006) de 25g. Pour l'Homme, le poids utilisé pour le calcul est de 70 kg.

Soit une dose critique :

$$\text{NOAEL}_{\text{HED}} = 163 \times (0,022 / 70)^{1/4} = 22 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ p.c}$$

⁸ Cette équation est issue des recommandations de l'US EPA (US EPA, 2006).

5.3.4 Choix des facteurs d'incertitude

Le calcul de la VTR à partir de $22 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ p.c}$ a été effectué à l'aide des facteurs d'incertitude suivants (Anses, 2015) :

- Variabilité inter-espèces (UF_A) :

L'ajustement allométrique réalisé a permis de calculer une dose équivalente humaine, à l'aide de l'équation précédente. Pour tenir compte de la variabilité toxicodynamique et d'incertitudes résiduelles, un facteur d'incertitude supplémentaire a été fixé à 2,5 selon les recommandations de l'IPCS (IPCS, 2005) et sur la base des pratiques de l'Anses.

- Variabilité interindividuelle (UF_H) :

Les données humaines observées sont en faveur de l'existence de populations sensibles : les enfants, selon l'étude de Rodrigue *et al.* (1990), ce qui a conduit à choisir une valeur par défaut de 10 pour la variabilité inter-individuelle.

- Transposition subchronique à chronique (UF_S) : 1

Aucune transposition de la durée de l'étude n'est nécessaire car l'étude retenue est une étude de toxicité aiguë, donc un UF_S d'une valeur de 1 peut être utilisé pour calculer la VTR aiguë.

- Utilisation d'un NOAEL/C ($UF_{B/L}$) : 1

L'ECHA recommande d'utiliser un facteur $UF_{B/L}$ de 1 lorsque l'étude-clé sélectionnée permet d'utiliser un NOAEL.

- Insuffisance des données (UF_D) : 10

Comme mentionnée précédemment, les études épidémiologiques et expérimentales souffrent de divers biais. À ces derniers s'ajoutent d'autres lacunes telles que les informations disponibles sur la toxicité de chacun des variants de la STX couramment retrouvés dans les produits de la mer, qui sont souvent limitées. Plusieurs études (Selwood *et al.*, 2017 ; Farrer *et al.*, 2015) concluant que les facteurs d'équivalences de toxicité établis par l'EFSA en 2009 devraient être révisés, le CES rappelle le besoin d'informations sur les TEF spécifiques de chacun des variants de la STX sous forme purifiée. Il est donc préférable d'appliquer un UF_D de 10.

En outre, du fait de la sévérité de l'effet critique retenu et pour pallier les risques potentiels d'autres variants tels que la néoSTX, pour laquelle l'étude de Munday *et al.* (2013) met en évidence un NOAEL de 276 nmol.kg^{-1} , le CES choisit d'appliquer un UF_D de 10.

Un facteur d'incertitude global de 250 est donc utilisé pour la construction de la VTR.

5.3.5 Proposition de VTR aiguë par voie orale

$$\text{VTR} = 0,1 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ p.c .j}^{-1}$$

5.3.6 Niveau de confiance

Le niveau de confiance global a été attribué à cette VTR en se basant sur les critères suivants :

- Niveau de confiance dans la nature et la qualité dans le corpus de données : **faible**.

Les données épidémiologiques souffrent de biais analytiques relatifs à l'identification et l'estimation des quantités de toxines auxquelles les individus sont exposés. Les études expérimentales *in vivo*, peu nombreuses, ne mettent pas nécessairement en évidence de

NOAEL, mais davantage de DL₅₀. D'autre part, les quelques études exposant des souris à diverses PST *via* l'eau de boisson, quantifient les effets toxiques par observation visuelle uniquement, ou s'appuie uniquement sur le test de préhension, pour l'étude de Munday *et al.* (2013).

- Niveau de confiance dans le choix de l'effet critique et le mode d'action : **fort**.
Malgré les lacunes concernant les TEF des variants de la STX, le mécanisme de toxicité de la STX est bien documenté dans la littérature scientifique. La STX étant l'une des toxines marines les plus toxiques, les signes cliniques d'une intoxication apparaissent rapidement et peuvent évoluer vers la mort par paralysie respiratoire dans un délai très court. Même si les signes cliniques d'une intoxication à la STX ou ses dérivées sont bien connus, le choix d'un effet critique pour établir une valeur sanitaire est cependant difficile.
- Niveau de confiance de l'étude-clé : **moyen-faible**
L'étude-clé de Munday *et al.* (2013) choisie est de qualité moyenne. Le design de l'étude est suffisant, mais des précisions font défaut notamment concernant les doses administrées aux souris, ce qui empêche de calculer une BMD. Le CES rappelle toutefois que même avec davantage d'informations dans l'étude, le calcul d'une BMD serait délicat du fait du mécanisme de toxicité qui rend difficile l'établissement d'une relation effet-dose. En outre, la quantification des effets toxiques dans l'étude est essentiellement fondée sur l'observation visuelle des animaux, et objective la dysfonction des muscles squelettiques par un test de préhension.
- Niveau de confiance dans le choix de la dose critique : **faible**
Le NOAEL de 544 nmol.kg⁻¹ est indiqué dans l'étude-clé, cependant l'étude ne détaille pas les différentes doses administrées aux souris. Ceci ne permet pas de connaître l'intervalle avec la dose supérieure, et donc de vérifier avec certitude que le NOAEL décrit est le plus fidèle possible. La quantification de la dose critique est donc approximative et est réalisée par une méthode peu robuste.
- Le niveau de confiance global pour cette VTR est donc : **faible**
Il n'a pas pu être retenu de BMD du fait de l'absence de relation effet-dose claire pouvant être retenue.

Le niveau de confiance global attribué par le CES pour cette VTR est donc faible. Ce niveau de confiance pourra être réévalué sous réserve de nouvelles études alimentant le corpus de données relatif à la toxicité de la STX.

6 Conclusions du CES

Une VTR aiguë par voie orale est proposée pour la STX, basée sur la dysfonction des muscles squelettiques. Un niveau de confiance **faible** a été attribué à cette VTR.

Tableau 5 : VTR aiguë par voie orale pour la STX

Effet critique (étude-clé)	Concentration critique	UF	VTR
Dysfonction des muscles squelettiques Munday <i>et al.</i> , 2013	NOAEL = 163 µg.kg ⁻¹ p.c .j ⁻¹	250	VTR = 0,1 µg.kg⁻¹ p.c .j⁻¹
	<u>Ajustement allométrique</u>	UF _A : 2,5 UF _D : 10 UF _H : 10 UF _L : 1 UF _S : 1	
	NOAEL _{HED} = 22 µg.kg ⁻¹ p.c .j ⁻¹		Niveau de confiance Faible

Le CES souligne que cette VTR est susceptible d'être réévaluée si de nouvelles études de toxicité aiguë par voie orale utilisant la méthode HPLC sont publiées et permettent d'alimenter les connaissances sur la toxicité relative à l'ingestion de la STX. Malgré le niveau de confiance faible défini pour cette VTR, le CES rappelle qu'étant donné la toxicité importante de la STX et l'enjeu de santé publique que représente les cyanotoxines pour les agences régionales de santé, il a été décidé d'établir une VTR pour la STX, ce qui représente un premier pas dans la protection des expositions potentielles de la population française à la STX. Enfin, comme mentionné précédemment la toxicité importante de la STX amène le CES à mettre en garde sur la gravité des intoxications possibles si la VTR proposée est dépassée.

Date de validation du rapport d'expertise collective par le comité d'experts spécialisé : le 17/10/2019.

Signature :

Maisons-Alfort, le
M F Michiels
Au nom des experts du CES
« Valeurs sanitaires de référence »,

M Fabrice MICHIELS
Président du CES

7 Bibliographie

Date de fin de la recherche bibliographique : Décembre 2018

- Afssa. 2008. AVIS de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la pertinence des outils de détection des phycotoxines lipophiles dans les coquillages.
- Ahern, C. A., J. Payandeh, F. Bosmans et B. Chanda. 2016. "The hitchhiker's guide to the voltage-gated sodium channel galaxy." *J Gen Physiol* 147 (1):1-24. doi: 10.1085/jgp.201511492.
- Andrinolo, D., P. Gomes, S. Fraga, P. Soares-Da-Silva et N. Lagos. 2002. "Transport of the organic cations gonyautoxin 2/3 epimers, a paralytic shellfish poison toxin, through the human and rat intestinal epitheliums." *Toxicon* 40 (10):1389-1397. doi: 10.1016/S0041-0101(02)00118-6.
- Andrinolo, D., V. Iglesias, C. García et N. Lagos. 2002. "Toxicokinetics and toxicodynamics of gonyautoxins after an oral toxin dose in cats." *Toxicon* 40 (6):699-709. doi: 10.1016/S0041-0101(01)00263-X.
- Andrinolo, D., L. F. Michea et N. Lagos. 1999. "Toxic effects, pharmacokinetics and clearance of saxitoxin, a component of paralytic shellfish poison (PSP), in cats." *Toxicon* 37 (3):447-464. doi: 10.1016/S0041-0101(98)00173-1.
- Anses. 2017. "Valeurs toxicologiques de référence (VTR) Guide d'élaboration de VTR de l'Anses."
- Anses. 2019. AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à l'évaluation des risques sanitaires liés aux pinnatoxines dans les coquillages.
- Arnich, N. et A. Thébault. 2018. "Dose-Response Modelling of Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) in Humans." *Toxins* 10 (4). doi: 10.3390/toxins10040141.
- Australian Government. 2011. Australian Drinking Water Guidelines 6 (2001) Version 3.4 updated october 2017. édité par National Health and Medical Research Council.
- Bourdin, Céline. 2013. "Etude des sous-unités auxiliaires du canal sodium dépendant du potentiel d'insecte :
- Approches moléculaires, électrophysiologiques et pharmacologiques. ." Neurosciences, Université d'Angers.
- Brackenbury, William J., Jeffrey D. Calhoun, Chunling Chen, Haruko Miyazaki, Nobuyuki Nukina, Fumitaka Oyama, Barbara Ranscht et Lori L. Isom. 2010. "Functional reciprocity between Na⁺ channel Nav1.6 and beta1 subunits in the coordinated regulation of excitability and neurite outgrowth." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (5):2283-2288. doi: 10.1073/pnas.0909434107.
- Brazilian Ministry of Health. 2011. "Drinking water nom - Regulation n°2914/2011."
- Cervantes Cianca, R. C., L. R. Faro, B. R. Duran et P. M. Alfonso. 2011. "Alterations of 3,4-dihydroxyphenylethylamine and its metabolite 3,4-dihydroxyphenylacetic produced in rat brain tissues after systemic administration of saxitoxin." *Neurochem Int* 59 (5):643-7. doi: 10.1016/j.neuint.2011.06.005.
- Cervenka, R., T. Zarrabi, P. Lukacs et H. Todt. 2010. "The outer vestibule of the Na⁺ channel-toxin receptor and modulator of permeation as well as gating." *Mar Drugs* 8 (4):1373-93. doi: 10.3390/md8041373.
- Cheymol, J., F. Bourillet, P. Long et M. Roch-Arveiller. 1968. "[Neuromuscular paralyzing action of saxitoxin]." *Arch Int Pharmacodyn Ther* 174 (2):393-412.
- Cheymol, J. et T. Toan. 1969. "[Paralyzing neuromuscular activity of saxitoxin in rats]." *Thérapie* 24 (1):191-8.

- Cianca, R. C. C., R. D. Barbosa, L. R. F. Faro, L. V. Adan, A. Gago-Martínez et M. A. Pallares. 2009. "Differential changes of neuroactive amino acids in samples obtained from discrete rat brain regions after systemic administration of saxitoxin." *Neurochemistry International* 54 (5-6):308-313. doi: 10.1016/j.neuint.2008.12.014.
- Cianca, R. C. C., M. A. Pallares, R. D. Barbosa, L. V. Adan, J. M. L. Martins et A. Gago-Martínez. 2007. "Application of precolumn oxidation HPLC method with fluorescence detection to evaluate saxitoxin levels in discrete brain regions of rats." *Toxicon* 49 (1):89-99. doi: 10.1016/j.toxicon.2006.09.021.
- Cohen, S. G. et C. B. Reif. 1953. "Cutaneous sensitization to blue-green algae." *J Allergy* 24 (5):452-7.
- Coleman, R. M., G. Ojeda-Torres, W. Bragg, D. Fearey, P. McKinney, L. Castrodale, D. Verbrugge, K. Stryker, E. DeHart, M. Cooper, E. Hamelin, J. Thomas et R. C. Johnson. 2018. "Saxitoxin Exposure Confirmed by Human Urine and Food Analysis." *J Anal Toxicol* 42 (7):e61-e64. doi: 10.1093/jat/bky031.
- Da Silva, C. A., E. C. De Moraes, M. D. Costa, J. L. Ribas, I. C. Guiloski, W. A. Ramsdorf, S. M. Zanata, M. M. Cestari, C. A. Ribeiro, V. F. Magalhaes, V. L. Trudeau et H. C. de Assis. 2014. "Saxitoxins induce cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress in teleost neurons in vitro." *Toxicon* 86:8-15. doi: 10.1016/j.toxicon.2014.04.016.
- Da Silva, C. A., E. T. Oba, W. A. Ramsdorf, V. F. Magalhaes, M. M. Cestari, C. A. Oliveira Ribeiro et H. C. Silva de Assis. 2011. "First report about saxitoxins in freshwater fish *Hoplias malabaricus* through trophic exposure." *Toxicon* 57 (1):141-7. doi: 10.1016/j.toxicon.2010.10.015.
- Davio, S. R. 1985. "Neutralization of saxitoxin by anti-saxitoxin rabbit serum." *Toxicon* 23 (4):669-75. doi: 10.1016/0041-0101(85)90371-x.
- De Revers, B. 2002. *Biologie et phylogénie des algues*. Vol. t.1, Belin.
- De Revers, B. 2003. *Biologie et phylogénie des algues*. Edité par Belin. Vol. t.2.
- Diehl, F., P. B. Ramos, J. M. dos Santos, D. M. Barros et J. S. Yunes. 2016. "Behavioral alterations induced by repeated saxitoxin exposure in drinking water." *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases* 22 (1). doi: 10.1186/s40409-016-0072-9.
- Duran-Riveroll, L. M., A. D. Cembella, C. J. Band-Schmidt, J. J. Bustillos-Guzman et J. Correa-Basurto. 2016. "Docking Simulation of the Binding Interactions of Saxitoxin Analogs Produced by the Marine Dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* to the Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.4." *Toxins* 8 (5). doi: 10.3390/toxins8050129.
- EFSA. 2009. "Marine Biotoxins in shellfish - Saxitoxin group." *EFSA Journal* (25 march 2009):1-76.
- Eijkelkamp, N., J. E. Linley, M. D. Baker, M. S. Minett, R. Cregg, R. Werdehausen, F. Rugiero et J. N. Wood. 2012. "Neurological perspectives on voltage-gated sodium channels." *Brain* 135 (Pt 9):2585-612. doi: 10.1093/brain/aws225.
- FAO. 2003. *Assessment and Management of Seafood Safety and Quality*.
- FAO/WHO. 2016. Toxicity Equivalency Factors for Marine Biotoxins Associated with Bivalve Molluscs.
- Farrer, D., M. Counter, R. Hillwig et C. Cude. 2015. "Health-based cyanotoxin guideline values allow for cyanotoxin-based monitoring and efficient public health response to cyanobacterial blooms." *Toxins* 7 (2):457-477. doi: 10.3390/toxins7020457.
- Finch, S. C., M. J. Boundy et D. T. Harwood. 2018. "The Acute Toxicity of Tetrodotoxin and Tetrodotoxin-Saxitoxin Mixtures to Mice by Various Routes of Administration." *Toxins* 10 (11). doi: 10.3390/toxins10110423.
- Gad, S. E. 2014. "Saxitoxin." Dans *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*, 218-220. : Elsevier.

- Garcia, C., A. Barriga, J. C. Diaz, M. Lagos et N. Lagos. 2010. "Route of metabolization and detoxication of paralytic shellfish toxins in humans." *Toxicon* 55 (1):135-44. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.07.018.
- Garcia, C., M. del Carmen Bravo, M. Lagos et N. Lagos. 2004. "Paralytic shellfish poisoning: post-mortem analysis of tissue and body fluid samples from human victims in the Patagonia fjords." *Toxicon* 43 (2):149-58. doi: 10.1016/j.toxicon.2003.11.018.
- Garcia, C., M. Lagos, D. Truan, K. Lattes, O. Vejar, B. Chamorro, V. Iglesias, D. Andrinolo et N. Lagos. 2005. "Human intoxication with paralytic shellfish toxins: clinical parameters and toxin analysis in plasma and urine." *Biol Res* 38 (2-3):197-205. doi: 10.4067/s0716-97602005000200009.
- Geh, Esmond N., Armah A. de la Cruz, Debajyoti Ghosh, Gerard Stelma et Jonathan A. Bernstein. 2016. "Sensitization of a child to Cyanobacteria after recreational swimming in a lake." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 137 (6):1902-1904.e3. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.12.1340>.
- Gessner, B. D., P. Bell, G. J. Doucette, E. Moczydlowski, M. A. Poli, F. Van Dolah et S. Hall. 1997. "Hypertension and identification of toxin in human urine and serum following a cluster of mussel-associated paralytic shellfish poisoning outbreaks." *Toxicon* 35 (5):711-722. doi: 10.1016/S0041-0101(96)00154-7.
- Gessner, B. D. et J. P. Middaugh. 1995. "Paralytic shellfish poisoning in Alaska: a 20-year retrospective analysis." *Am J Epidemiol* 141 (8):766-70. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a117499.
- Hackett, J. D., J. H. Wisecaver, M. L. Brosnahan, D. M. Kulis, D. M. Anderson, D. Bhattacharya, F. G. Plumley et D. L. Erdner. 2013. "Evolution of saxitoxin synthesis in cyanobacteria and dinoflagellates." *Mol Biol Evol* 30 (1):70-8. doi: 10.1093/molbev/mss142.
- Heinemann, S. H., H. Terlau, W. Stühmer, K. Imoto et S. Numa. 1992. "Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations." *Nature* 356 (6368):441-443. doi: 10.1038/356441a0.
- Hines, H. B., S. M. Naseem et R. W. Wannemacher Jr. 1993. "[3H]-Saxitoxinol metabolism and elimination in the rat." *Toxicon* 31 (7):905-908. doi: 10.1016/0041-0101(93)90226-9.
- Hong, B., H. Chen, J. Han, Q. Xie, J. He, K. Bai, Y. Dong et R. Yi. 2017. "A Study of 11-[(3)H]-Tetrodotoxin Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion (ADME) in Adult Sprague-Dawley Rats." *Mar Drugs* 15 (6). doi: 10.3390/md15060159.
- Ianora, A., M. G. Bentley, G. S. Caldwell, R. Casotti, A. D. Cembella, J. Engström-Öst, C. Halsband, E. Sonnenschein, C. Legrand, C. A. Llewellyn, A. Paldavičienė, R. Pilkaityte, G. Pohnert, A. Razinkovas, G. Romano, U. Tillmann et D. Vaiciute. 2011. "The relevance of marine chemical ecology to plankton and ecosystem function: An emerging field." *Marine Drugs* 9 (9):1625-1648. doi: 10.3390/md9091625.
- Jones, S. W. et T. N. Marks. 1989. "Calcium currents in bullfrog sympathetic neurons. I. Activation kinetics and pharmacology." *J Gen Physiol* 94 (1):151-67. doi: 10.1085/jgp.94.1.151.
- Kao, C. Y. 1993. "Paralytic shellfish poisoning. Algal toxins in seafood and drinking water." *London Academic Press*:75-86.
- Kao, P. N., M. R. James-Kracke et C. Y. Kao. 1983. "The active guanidinium group of saxitoxin and neosaxitoxin identified by the effects of pH on their activities on squid axon." *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 398 (3):199-203.
- Knaack, J. S., K. A. Porter, J. T. Jacob, K. Sullivan, M. Forester, R. Y. Wang, V. L. Trainer, S. Morton, G. Eckert, E. McGahee, J. Thomas, J. McLaughlin et R. C. Johnson. 2016. "Case diagnosis and characterization of suspected paralytic shellfish poisoning in Alaska." *Harmful Algae* 57:45-50. doi: 10.1016/j.hal.2016.03.006.

- Kohane, D. S., N. T. Lu, A. C. G. Gökgöl-Kline, C. B. Berde, M. Shubina, Y. Kuang, S. Hall et G. R. Strichartz. 2000. "The local anesthetic properties and toxicity of saxitoxin homologues for rat sciatic nerve block in vivo." *Regional Anesthesia and Pain Medicine* 25 (1):52-59. doi: 10.1016/S1098-7339(00)80011-5.
- Kuiper-Goodman, T. et T. Todd. 1991. *Health hazard assessment of PSP in Canadian shellfish*: Health Canada.
- Kvitek, R. et C. Bretz. 2004. "Harmful algal bloom toxins protect bivalve populations from sea otter predation." *Marine Ecology Progress Series* 271:233-243. doi: 10.3354/meps271233.
- Langeland, G., T. Hasselgard, K. Tangen, O. M. Skulberg et A. Hjelle. 1984. "An outbreak of paralytic shellfish poisoning in western Norway." *Sarsia* 69:185-193.
- Lefebvre, K. A., V. L. Trainer et N. L. Scholz. 2004. "Morphological abnormalities and sensorimotor deficits in larval fish exposed to dissolved saxitoxin." *Aquat Toxicol* 66 (2):159-70. doi: 10.1016/j.aquatox.2003.08.006.
- Llewellyn, L. E. 2006. "Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors." *Nat Prod Rep* 23 (2):200-22. doi: 10.1039/b501296c.
- Llewellyn, L. E., P. M. Bell et E. G. Moczydlowski. 1997. "Phylogenetic survey of soluble saxitoxin-binding activity in pursuit of the function and molecular evolution of saxiphilin, a relative of transferrin." *Proc Biol Sci* 264 (1383):891-902. doi: 10.1098/rspb.1997.0124.
- Llewellyn, L. E., M. J. Dodd, A. Robertson, G. Ericson, C. De Koning et A. P. Negri. 2002. "Post-mortem analysis of samples from a human victim of a fatal poisoning caused by the xanthid crab, *Zosimus aeneus*." *Toxicon* 40 (10):1463-1469. doi: 10.1016/S0041-0101(02)00164-2.
- McCollum, J. P. K., R. C. M. Pearson, H. R. Ingham, P. C. Wood et H. A. Dewar. 1968. "AN EPIDEMIC OF MUSSEL POISONING IN NORTH-EAST ENGLAND." *The Lancet* 292 (7571):767-770. doi: 10.1016/S0140-6736(68)90967-7.
- Melegari, S. P., C. R. de Carvalho Pinto, S. Moukha, E. E. Creppy et W. G. Matias. 2015. "Evaluation of Cytotoxicity and Cell Death Induced In Vitro by Saxitoxin in Mammalian Cells." *J Toxicol Environ Health A* 78 (19):1189-200. doi: 10.1080/15287394.2015.1072069.
- Meyer, K. F. 1953. "Food Poisoning." *New England Journal of Medicine* 249 (21):843-852. doi: 10.1056/NEJM195311192492105.
- Munday, R., K. Thomas, R. Gibbs, C. Murphy et M. A. Quilliam. 2013. "Acute toxicities of saxitoxin, neosaxitoxin, decarbamoyl saxitoxin and gonyautoxins 1&4 and 2&3 to mice by various routes of administration." *Toxicon* 76:77-83. doi: 10.1016/j.toxicon.2013.09.013.
- Narahashi, T. 1972. "Mechanism of action of tetrodotoxin and saxitoxin on excitable membranes." *Federation Proceedings* 31 (3):1124-1132.
- New Zealand Ministry of Health. 2018. *Drinking-water Standards for New Zealand 2005 (revised 2018)*. Wellington.
- Noda, M., H. Suzuki, S. Numa et W. Stuhmer. 1989. "A single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity on the sodium channel II." *FEBS Lett* 259 (1):213-6.
- Oberemm, A., J. Becker, G. A. Codd et C. Steinberg. 1999. "Effects of cyanobacterial toxins and aqueous crude extracts of cyanobacteria on the development of fish and amphibians." *Environmental Toxicology* 14 (1):77-88. doi: 10.1002/(SICI)1522-7278(199902)14:1<77::AID-TOX11>3.0.CO;2-F.
- Ohio EPA. 2015. *Public Water System Harmful Algae Bloom Response Strategy*.
- Oregon Health Authority. 2018. *Cyanotoxin Facts: Recreational and Drinking Water*. édité par Public Health Division. Portland.
- Oregon Health Authority. 2019. *Oregon Harmful Algae Bloom Surveillance (HABS) Program - Recreational Use Public Health Advisory Guidelines Cyanobacterial Blooms in Freshwater Bodies*. édité par Public Health Division. Portland.

- Pilotto, L., P. Hobson, M. D. Burch, G. Ranmuthugala, R. Attewell et W. Weightman. 2004. "Acute skin irritant effects of cyanobacteria (blue-green algae) in healthy volunteers." *Aust N Z J Public Health* 28 (3):220-4.
- Popkiss, M. E., D. A. Horstman et D. Harpur. 1979. "Paralytic shellfish poisoning. A report of 17 cases in Cape Town." *S Afr Med J* 55 (25):1017-23.
- Prakash A, Medcof JC and Tennant AD. 1971. *Paralytic shellfish poisoning in eastern Canada*. Vol. 177: Fish. Board Res. Can.
- Ramos, P. B., F. Diehl, J. M. dos Santos, J. M. Monserrat et J. S. Yunes. 2014. "Oxidative stress in rats induced by consumption of saxitoxin contaminated drink water." *Harmful Algae* 37:68-74. doi: 10.1016/j.hal.2014.04.002.
- Rapala, J., A. Robertson, A. P. Negri, K. A. Berg, P. Tuomi, C. Lyra, K. Erkomaa, K. Lahti, K. Hoppu et L. Lepisto. 2005. "First report of saxitoxin in Finnish lakes and possible associated effects on human health." *Environ Toxicol* 20 (3):331-40. doi: 10.1002/tox.20109.
- Ritchie, J. M. et R. B. Rogart. 1977. "The binding of saxitoxin and tetrodotoxin to excitable tissue." *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology* 79:1-50.
- Rodrigue, D. C., R. A. Etzel, S. Hall, E. De Porras, O. H. Velasquez, R. V. Tauxe, E. M. Kilbourne et P. A. Blake. 1990. "Lethal paralytic shellfish poisoning in Guatemala." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 42 (3):267-271. doi: 10.4269/ajtmh.1990.42.267.
- Rogart, R. 1981. "Sodium Channels in Nerve and Muscle Membrane." *Annual Review of Physiology* 43 (1):711-725. doi: 10.1146/annurev.ph.43.030181.003431.
- Schantz, Edward J., James D. Mold, D. Warren Stanger, John Shavel, Frank J. Riel, John P. Bowden, Joseph M. Lynch, Ruth Savage Wyler, Byron Riegel et Hermann Sommer. 1957. "Paralytic Shellfish Poison. VI. A Procedure for the Isolation and Purification of the Poison from Toxic Clam and Mussel Tissues." *Journal of the American Chemical Society* 79 (19):5230-5235. doi: 10.1021/ja01576a044.
- Selwood, A. I., C. Waugh, D. T. Harwood, L. L. Rhodes, J. Reeve, J. Sim et R. Munday. 2017. "Acute toxicities of the saxitoxin congeners gonyautoxin 5, gonyautoxin 6, decarbamoyl gonyautoxin 2&3, decarbamoyl neosaxitoxin, C-1&2 and C-3&4 to mice by various routes of administration." *Toxins* 9 (2). doi: 10.3390/toxins9020073.
- Seven, M. J. 1958. "Mussel poisoning." *Ann Intern Med* 48 (4):891-7. doi: 10.7326/0003-4819-48-4-891.
- Sharifzadeh, K., N. Ridley, R. Waskiewicz, P. Luongo, G.F. Grady, A. De Maria, R.J. Timperi, J. Nassif, M. Sugita, V. Gehrman, P Peterson, A. Alexander, R. Barrett, K. Ballentine, JP. Middaugh et I. Somerset. 1990. "Epidemiologic notes and reports paralytic shellfish poisoning - Massachusetts and Alaska." *Morbidity Mortality Weekly Report* 10 (10):157-160.
- Shen, H., Z. Li, Y. Jiang, X. Pan, J. Wu, B. Cristofori-Armstrong, J. J. Smith, Y. K. Y. Chin, J. Lei, Q. Zhou, G. F. King et N. Yan. 2018. "Structural basis for the modulation of voltage-gated sodium channels by animal toxins." *Science* 362 (6412). doi: 10.1126/science.aau2596.
- Soto-Liebe, K., A. A. Murillo, B. Krock, K. Stucken, J. J. Fuentes-Valdés, N. Trefault, A. Cembella et M. Vásquez. 2010. "Reassessment of the toxin profile of *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 and function of putative sulfotransferases in synthesis of sulfated and sulfonated PSP toxins." *Toxicon* 56 (8):1350-1361. doi: 10.1016/j.toxicon.2010.07.022.
- Stafford, R. G. et H. B. Hines. 1995. "Urinary elimination of saxitoxin after intravenous injection." *Toxicon* 33 (11):1501-10.
- Su, Z., M. Sheets, H. Ishida, F. Li et W. H. Barry. 2004. "Saxitoxin blocks L-type ICa." *J Pharmacol Exp Ther* 308 (1):324-9. doi: 10.1124/jpet.103.056564.
- Szentandrassy, N., D. Nagy, F. Ruzsnaszky, G. Harmati, T. Banyasz, J. Magyar, A. J. Szentmiklosi et P. P. Nanasi. 2011. "Powerful technique to test selectivity of agents acting on cardiac ion channels: the action potential voltage-clamp." *Curr Med Chem* 18 (24):3737-56.

- Tennant, A. D., J. Naubert et H. E. Corbeil. 1955. "An outbreak of paralytic shellfish poisoning." *Canadian Medical Association journal* 72 (6):436-439.
- Testai, E., S. Scardala, S. Vichi, F. M. Buratti et E. Funari. 2016. "Risk to human health associated with the environmental occurrence of cyanobacterial neurotoxic alkaloids anatoxins and saxitoxins." *Critical Reviews in Toxicology* 46 (5):385-419. doi: 10.3109/10408444.2015.1137865.
- Thottumkara, A. P., W. H. Parsons et J. Du Bois. 2014. "Saxitoxin." *Angew Chem Int Ed Engl* 53 (23):5760-84. doi: 10.1002/anie.201308235.
- Torres, R., L. Pizarro, A. Csendes, C. Garcia et N. Lagos. 2007. "GTX 2/3 epimers permeate the intestine through a paracellular pathway." *J Toxicol Sci* 32 (3):241-8.
- Turner, Andrew D., Robert G. Hatfield, Benjamin H. Maskrey, Myriam Algoet et Jim F. Lawrence. 2019. "Evaluation of the new European Union reference method for paralytic shellfish toxins in shellfish: A review of twelve years regulatory monitoring using pre-column oxidation LC-FLD." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 113:124-139. doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.02.005>.
- Wang, C. H., Y. Y. Wang, Y. Y. Sun et X. T. Xie. 2003. "Effect of antibiotic treatment on toxin production by *Alexandrium tamarens*." *Biomed Environ Sci* 16 (4):340-7.
- Washington State Department of Health. 2011. Washington State Provisional Recreational Guidance for Cylindrospermopsin and Saxitoxin. édité par Division of Environmental Health. Olympia.
- Wiberg, G. S. et N. R. Stephenson. 1960. "Toxicologic studies on paralytic shellfish poison." *Toxicology and Applied Pharmacology* 2 (6):607-615. doi: [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(60\)90078-8](https://doi.org/10.1016/0041-008X(60)90078-8).
- Wiese, M., P. M. D'Agostino, T. K. Mihali, M. C. Moffitt et B. A. Neilan. 2010. "Neurotoxic alkaloids: Saxitoxin and its analogs." *Marine Drugs* 8 (7):2185-2211. doi: 10.3390/md8072185.
- Yotsu-Yamashita, M., A. Sugimoto, T. Terakawa, Y. Shoji, T. Miyazawa et T. Yasumoto. 2001. "Purification, characterization, and cDNA cloning of a novel soluble saxitoxin and tetrodotoxin binding protein from plasma of the puffer fish, *Fugu pardalis*." *Eur J Biochem* 268 (22):5937-46. doi: 10.1046/j.0014-2956.2001.02547.x.
- Yu, F. H., V. Yarov-Yarovoy, G. A. Gutman et W. A. Catterall. 2005. "Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily." *Pharmacological Reviews* 57 (4):387-95. doi: 10.1124/pr.57.4.13.
- Zepeda, R. J., M. Candiracci, N. Lobos, S. Lux et H. F. Miranda. 2014. "Chronic toxicity study of neosaxitoxin in rats." *Marine Drugs* 12 (9):5055-5071. doi: 10.3390/md12095055.

ANNEXES

Annexe 1 : Lettre de saisine



MINISTÈRE DES AFFAIRES SOCIALES ET DE LA SANTÉ

DIRECTION GÉNÉRALE DE LA SANTÉ
Sous-direction de la prévention des risques
liés à l'environnement et à l'alimentation
Bureau Qualité des eaux
DGS/EA4 n° 284

Béatrice JÉDOR
☎ : 01.40.56.45.99
betrice.jedor@sante.gouv.fr

Boris GARRO
☎ : 01.40.56.57.35
boris.garro@sante.gouv.fr

Paris, le 19 JUL. 2016

Le Directeur général de la santé

à

Monsieur le Directeur général
de l'Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement
et du travail
Direction de l'Évaluation des Risques
(D.E.R.) - UERE
14 rue Pierre et Marie Curie
94701 MAISONS ALFORT CEDEX

OBJET : Demande d'actualisation de l'évaluation 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

REF : DGS EA4 N° 160008 (*numéro de dossier à rappeler dans toute correspondance*)

En janvier 2001, le ministère chargé de la santé a saisi l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) afin d'effectuer une évaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries dans les eaux destinées à la consommation humaine. En mars 2004, les ministères chargés de l'environnement et de la santé ont saisi l'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (Afsset) afin de procéder à l'évaluation des risques sanitaires encourus par les baigneurs et les autres usagers des plans et cours d'eau et de proposer des valeurs limites de qualité relatives à la concentration de cellules et/ou toxines dans les eaux de baignade. En juillet 2006, les deux agences ont publié un rapport commun¹ en réponse à ces deux saisines.

S'agissant de l'eau destinée à la consommation humaine (EDCH), les recommandations de l'Afssa de juillet 2006 sont appliquées par les Agences régionales de santé (ARS) pour gérer les risques sanitaires en cas d'efflorescence de cyanobactéries dans une retenue d'eau utilisée pour produire de l'EDCH. Depuis 2004, les analyses de cyanobactéries et cyanotoxines dans les eaux utilisées pour produire de l'eau potable et dans les EDCH se sont poursuivies en métropole et dans les départements d'Outre-mer. Des cyanobactéries potentiellement toxigènes ont récemment été observées dans des retenues utilisées pour produire de l'EDCH, à Mayotte notamment : *Cylindrospermopsis*, *Planktolynghya*, *Aphanizomenon*, *Aphanothece*, *Dolichospermum*, *Pseudanabaena*, *Oscillatoria*. Ces cyanobactéries peuvent produire des cyanotoxines (anatoxine-a, saxitoxine, cylindrospermopsine, debormalphysiatoxine, aphysiatoxine, lipopolysaccharides,...) pour lesquelles aucune donnée sur une valeur sanitaire acceptable ne figure dans le rapport précité.

S'agissant des eaux de baignade, les recommandations de l'Afsset ont été mentionnées dans différentes circulaires élaborées par mes services. En février 2015, un groupe de travail composé d'agents d'Agences régionales de santé (ARS) concernées par cette problématique a été réuni par la

¹ Évaluation 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 ; Afssa - Afsset ; Juillet 2006

DGS afin de dresser un état des lieux concernant la gestion des risques sanitaires liés à la présence de cyanobactéries dans les eaux de baignade. Bien qu'il était fait état à cette occasion d'un nombre très limité d'effets sanitaires liés aux cyanobactéries, il apparaît des difficultés de gestion importantes liées notamment aux seuils de cyanobactéries entraînant une interdiction de la baignade. Le constat a également été fait que les ARS disposent désormais de nombreuses données relatives aux cyanobactéries et cyanotoxines dans les eaux de baignade susceptibles d'apporter un éclairage sur les niveaux de contamination en cyanobactéries. Ces données n'étaient pas disponibles lorsque l'Afsset avait réalisé son évaluation des risques en 2006.

Aussi, il apparaît opportun de solliciter l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail afin d'actualiser l'expertise de 2006 à la lumière des nouvelles connaissances scientifiques et des nombreuses données d'exposition accumulées par les ARS depuis une dizaine d'années. Le contexte ultra-marin devra être pris en considération.

En regard de ces nouvelles données, je vous demande donc :

- eu égard au niveau de risque sanitaire et des moyens de gestion existants, d'actualiser les valeurs limites de qualité relatives à la concentration de cyanobactéries (dénombrement cellulaire, biovolume ou tout autre indicateur pertinent) et/ou de toxines dans les eaux destinées à l'alimentation et les eaux de baignade, en particulier pour les cylindrospermopsine et saxitoxine ;
- d'actualiser la liste des espèces de cyanobactéries toxigènes.

Par ailleurs, la disparité observée dans les laboratoires agréés s'agissant des méthodes analytiques utilisées pour le prélèvement, le dénombrement et la détermination des cyanobactéries dans les eaux destinées à la consommation humaine, à la baignade et à autres activités récréatives soulèvent des difficultés importantes en termes d'interprétation et de gestion des risques sanitaires par les ARS. Aussi, l'expertise scientifique et technique du laboratoire d'hydrologie de Nancy a été sollicitée afin de réaliser un recensement et une évaluation des méthodes de prélèvement et d'analyses pour le dénombrement et la détermination des cyanobactéries dans les EDCH, les eaux de baignade et autres eaux récréatives. Cette expertise aboutira à des recommandations à destination des laboratoires et, à terme, permettra la rédaction d'un référentiel en concertation avec les organismes de normalisation, d'accréditation et les associations de laboratoires.

Cette saisine, qui fait partie du programme de travail 2016, est enregistrée à la Direction générale de la santé sous l'intitulé suivant :

DEMANDE D'ACTUALISATION DE L'EVALUATION DES RISQUES LIES A LA PRESENCE DE CYANOBACTERIES ET LEURS TOXINES DANS LES EAUX DESTINEES A L'ALIMENTATION, A LA BAIGNADE ET AUTRES ACTIVITES RECREATIVES

et porte le numéro : 160008.

Je vous remercie de bien vouloir me transmettre, dans les meilleurs délais, votre proposition de contrat d'expertise comprenant notamment les modalités de traitement et de restitution des travaux, dont le rendu final est attendu pour la fin du 1^{er} semestre 2018 ; des premiers éléments issus de l'expertise, en particulier l'actualisation des valeurs limites, sont attendus d'ici fin 2017.

Le Directeur Général de la Santé,

Professeur Benoît VALLET

Annexe 2 : Recherche bibliographique complémentaire sur la période 26/11/2018 au 17/12/2018 – mots clés

Date de la recherche bibliographique : 26/11/2018 au 17/12/2018

Saxitoxine

Exposition aiguë par voie orale

Effect* / sensitivity /health / mortality / susceptibility / toxic*

Requête SCOPUS

TITLE-ABS-KEY (saxitoxin*) AND TITLE-ABS-KEY (toxicokinetic OR (absorption AND adme) OR (distribution AND adme) OR metabolism OR (excretion AND adme) OR adme OR oatp OR transporters OR intestinal OR bbb OR "blood brain barrier" OR "placental barrier" OR "glutathione transferases" OR cyp OR "cytochrome P450" OR cytotoxicity OR toxicity OR "adverse effects" OR mortality OR genotoxicity OR carcinogenicity OR "reproductive toxicity" OR neurotoxicity OR immunotoxicity OR vitro OR "in vivo" OR liver OR kidney OR sperm OR ovary OR testicles OR thyroid OR brain OR "mode of action" OR mechanism OR "short-term" OR acute OR "long-term" OR chronic)

Requête PUBMED

ALL FIELDS

(((toxicokinetic OR (absorption AND adme) OR (distribution AND adme) OR metabolism OR (excretion AND adme) OR adme OR oatp OR transporters OR intestinal OR bbb OR "blood brain barrier" OR "placental barrier" OR "glutathione transferases" OR cyp OR "cytochrome P450" OR cytotoxicity OR toxicity OR "adverse effects" OR mortality OR genotoxicity OR carcinogenicity OR "reproductive toxicity" OR neurotoxicity OR immunotoxicity OR vitro OR "in vivo" OR liver OR kidney OR sperm OR ovary OR testicles OR thyroid OR brain OR "mode of action" OR mechanism OR "short-term" OR acute OR "long-term" OR chronic)))

AND

(saxitoxin*)

Notes



Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail
14 rue Pierre et Marie Curie
F94701 Maisons-Alfort cedex
www.anses.fr
[@Anses_fr](https://twitter.com/Anses_fr)