

Bilan de la première année de surveillance par analyse chimique des phycotoxines lipophiles réglementées dans les coquillages mis sur le marché

Sophie Trotereau (1) (sophie.trotereau@anses.fr), Pierre Velge (2), Sophie Krysz (1), Virginie Hossen (1)

(1) Anses, Laboratoire de sécurité des aliments de Maisons-Alfort, Laboratoire national de référence pour le contrôle des biotoxines marines

(2) Direction générale de l'alimentation, Bureau des produits de la mer et d'eau douce, Paris

Résumé

En 2010, un changement majeur est intervenu en France puisant l'analyse chimique par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) a remplacé le bioessai sur souris pour la surveillance officielle des phycotoxines lipophiles dans les coquillages. Ce changement résulte d'une décision du ministère de l'agriculture, de l'alimentation, de la pêche, de la ruralité et de l'aménagement du territoire par anticipation de l'application du règlement n° 15/2011 du 10 janvier 2011 dans lequel s'inscrit le changement de méthode de référence au niveau européen. Ainsi, de début 2010 à fin 2011, le Laboratoire national de référence pour le contrôle des biotoxines marines (LNR) est en charge de la réalisation du plan de surveillance de la DGAL (coquillages au stade de la mise sur le marché), des investigations de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) et des autocontrôles. En 2010, la surveillance des zones de production de coquillages a été réalisée par le laboratoire des phycotoxines (PHYC) de l'Ifremer Nantes. Depuis mai 2011, cette surveillance a été déployée au sein de trois laboratoires Ifremer : PHYC, Sète (LER-LR) et Concarneau (LER-CC). Cet article dresse les conclusions générales de cette première année de surveillance ciblée des toxines lipophiles par LC-MS/MS pour les coquillages mis sur le marché.

Mots clés

Toxines lipophiles, analyse LC/MS, coquillages, plan de surveillance

Abstract

The first year of chemical analysis surveillance for regulated lipophilic phycotoxins in shellfish on the market: a review
By decision of the competent authorities, a physico-chemical analytical method was integrated in the French monitoring programme on 1st January 2010 to replace the mouse bioassay method. This decision was taken before the entry into force of Commission Regulation (EU) no. 15/2011 of 10th January 2011, which defines the LC-MS/MS method as the reference method to be used for lipophilic toxin analysis at the EU level. Thus, from the beginning of 2010 to the end of 2011, the lipophilic toxins monitoring programme relied on a limited number of national laboratories; on the one hand, the ANSES NRL carried out analyses for the monitoring programme determined by the General Directorate for Food (shellfish on the market), analyses emanating from professional self-controls and analyses related to food poisoning investigations. On the other hand, Ifremer laboratories were in charge of the analyses carried out in shellfish production areas (the Phycotoxins laboratory of Nantes from 2010 to May 2011 and then Ifremer Sète and Concarneau from May 2011). This article presents the conclusions of this first year of targeted monitoring of lipophilic toxins by LC-MS/MS.

Keywords

Lipophilic toxins, LC/MS-MS analysis, shellfish, monitoring plan

Le règlement n° 15/2011 du 10 janvier 2011 introduit une nouvelle approche analytique pour les toxines lipophiles; la méthode LC/MS-MS validée aux niveaux national et européen [1] s'applique aux quatre familles de toxines réglementées. Cette modification amende ainsi le règlement n° 2074/2005 du 5 décembre 2005 et officialise le remplacement du bioessai sur souris en tant que méthode de référence [2, 3]. Le bioessai sur souris reflète la toxicité globale d'un échantillon alors que l'analyse chimique cible certaines toxines et permet de déterminer son profil toxinique [4]. La teneur en toxines contenue dans l'échantillon, exprimée en équivalent par rapport à la molécule principale de la famille, est alors déterminée en prenant en compte la toxicité relative de chacun des analogues présents au travers de l'application de facteurs d'équivalence toxique proposés par l'EFSA [5] (Tableau 1).

Tableau 1. Familles de toxines réglementées, analogues recherchés et seuils réglementaires associés

Famille	Toxines réglementées, analogues recherchés	Seuils réglementaires
Acide okadaïque et ses analogues : AO, DTX	AO, DTX1, DTX2, DTX3	160 µg éq. AO /kg chair
Pecténotoxines : PTX	PTX1, PTX2	
Azaspiracides : AZA	AZA1, AZA2, AZA3	160 µg éq. AZA1/kg chair
Yessotoxines : YTX	YTX, 45OH YTX, homo YTX, homo 45OH YTX	1000 µg éq. YTX/kg chair

La méthode permet par ailleurs de quantifier certaines toxines non réglementées⁽¹⁾ afin d'acquies des données concernant leur présence dans les coquillages mis sur le marché en France (production nationale et importation).

Bilan des analyses de toxines lipophiles réalisées par le LNR

Parmi les 607 échantillons analysés par le LNR en 2010, 447 ont été analysés dans le cadre du plan de surveillance (PS) de la DGAL, une quinzaine sont des échantillons prélevés suite à des suspicions de TIAC et enfin 145 correspondent à des demandes d'autocontrôles. La Figure 1 présente la répartition mensuelle des échantillons.

Le pic d'activité observé au mois de décembre correspond majoritairement à l'analyse d'huîtres, en relation avec leur niveau élevé de consommation en cette période de l'année.

En ce qui concerne les échantillons prélevés par les DDPP dans le cadre du PS, on note une répartition homogène entre les huîtres, les moules et les pectinidés (respectivement 34 %, 33 % et 29 %) tandis que 4 % des analyses ont été faites sur d'autres coquillages plus rares sur le marché, tels les amandes de mer, praires ou palourdes (Figure 2). Cette répartition répond aux prescriptions de la note de service [6].

Par ailleurs, les moules constituent la majorité des 15 échantillons reçus dans le cadre de suspicion de TIAC.

(1) Gymnodimine GYM, pecténotoxine PTX2sa et spiroïdes SPX 13desMe C, SPXA, SPXB, SPXC et SPXD.

Pour le PS comme pour l'investigation de TIAC, les échantillons sont répartis de manière équilibrée entre les productions nationale et non nationale (Chili, Espagne, Irlande, Hollande notamment).

Sur l'ensemble des 462 analyses du PS et d'investigation de TIAC, seules quatre ont été trouvées supérieures aux seuils réglementaires (160 µg eq.AO/kg, 160 µg eq.AZA/kg et 1 mg eq.YTX/kg). Les informations relatives à ces échantillons sont présentées dans le [Tableau 2](#).

Résultats obtenus dans le cadre du plan de surveillance de la DGAL

À l'exception d'un échantillon de moules, tous les échantillons analysés dans le cadre du PS ont donné des résultats inférieurs aux seuils de salubrité. Ce taux de conformité de 99,8 % indique une situation très favorable de la situation sanitaire des coquillages vis-à-vis du risque toxique. L'échantillon de moules trouvé non conforme contenait une concentration en acide okadaïque environ trois fois supérieure au seuil réglementaire (531 µg OA/kg). Cet échantillon a été prélevé le 23 juin 2010 (semaine n) dans l'estuaire de la Loire. Les analyses REPHY réalisées en semaines n-1 et n n'ont pas révélé la présence de *Dinophysis*⁽²⁾ dans l'eau. S'agissant d'une zone et d'une période qui ne sont pas à risques, la présence de toxines dans les coquillages provenant de cette zone n'a pas été recherchée. Néanmoins, en semaine n, les analyses des moules d'une zone adjacente ont révélé une contamination à un niveau supérieur au seuil de salubrité (174 µg eq.AO/kg vs seuil de 160 µg eq.AO/kg), ce qui permettrait de comprendre la survenue de cet épisode. Trois foyers de TIAC ont été identifiés durant cette même période suite à la consommation de moules provenant de la zone de l'estuaire de la Loire. Cependant, la survenue de ces TIAC n'a pas pu être corrélée à la présence de toxines lipophiles car les lots consommés n'étaient plus disponibles.

Cette méthode chimique permet de déterminer les niveaux de contamination de chacune des toxines ciblées dans les coquillages. Ils constituent des données essentielles pour la détermination de l'exposition du consommateur. Le [Tableau 3](#) montre la répartition des diverses catégories de coquillages en fonction de six niveaux de contamination en acide okadaïque et analogues (AO + DTX).

Ces données permettent de constater que la grande majorité (≥ 80 %) des coquillages contiennent des teneurs inférieures ou égales à la limite de détection en toxines du groupe de l'acide okadaïque et analogues. Par ailleurs, les moules constituent la catégorie de coquillages qui présente les niveaux de contamination les plus élevés. Cela tend à confirmer les données de la littérature selon laquelle les moules ont une plus grande capacité à bio-accumuler ces toxines, de par leur grande capacité de filtration. Ces tendances devront être confirmées par les résultats des futurs PS.

Résultats obtenus dans le cadre d'investigations de TIAC

Sur les 15 échantillons reçus, cinq présentaient des quantités en toxines inférieures à la limite de détection, sept contenaient des teneurs en toxines à un niveau très inférieur aux seuils réglementaires (3/15 contiennent de 30 à 40 µg eq.AO/kg et 2/15 contiennent respectivement 2 deux et 12 µg eq.AZA/kg) ou des niveaux faibles de spirolides (3 trois et 13 µg eq.SPX/kg) et enfin, trois ont été trouvés supérieurs au seuil de salubrité pour la famille de l'acide okadaïque. Ces trois lots ont été incriminés dans 31 foyers de TIAC impliquant 246 malades recensés en France suite à la consommation de moules en provenance d'Espagne (Galice). Ces TIAC ont fait l'objet d'une alerte communautaire (RASFF Alert 2010.1226). L'analyse chimique de ces échantillons a révélé la présence d'acide okadaïque à un niveau trois fois supérieur au seuil de salubrité. Une étude de cohorte effectuée par l'InVS sur un des foyers impliquant le plus grand nombre de malades

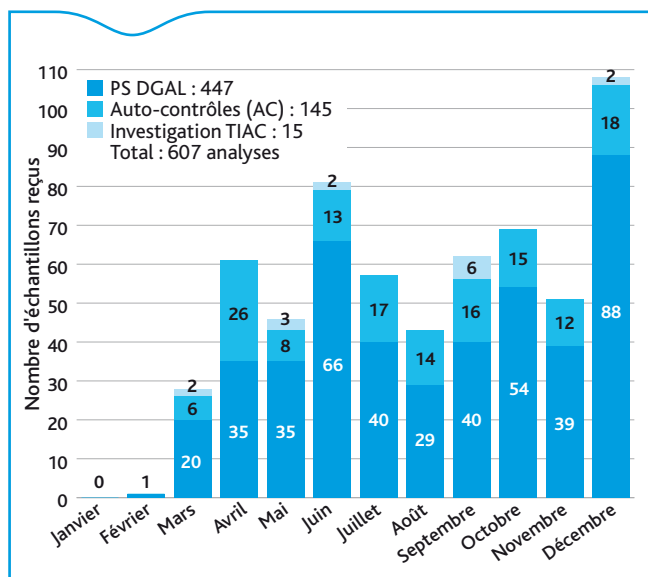


Figure 1. Répartition mensuelle des prélèvements pour recherche des toxines lipophiles par analyse chimique LC-MS/MS au cours de l'année 2010

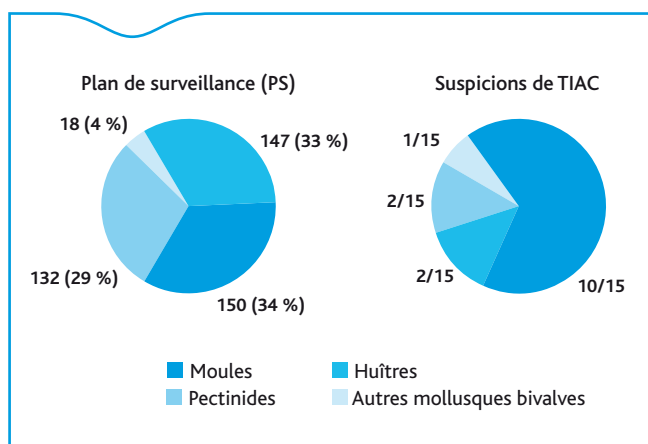


Figure 2. Répartition des échantillons du plan de surveillance et des suspicions de TIAC par type de coquillage

Tableau 2. Échantillons identifiés non conformes en 2010

Type de coquillages et cadre de l'analyse	Date de prélèvement	Origine	Résultats
Moules PS 2010	23 juin 2010	France, Zone 60 Banc du Nord	531,4 µg AO/kg chair 26,6 µg SPX13desMeC**/kg chair Autres toxines ≤ LD*
Moules TIAC	9 septembre 2010 Lots impliqués dans 31 foyers de TIAC (cf. paragraphe sur les résultats obtenus dans le cadre d'investigations de TIAC)	Espagne, Galice	Lot n° 1 : 533,6 µg AO/kg chair 1,1 µg SPX13desMeC/kg chair PTX2sa = 5,7 µg PTX2/kg chair Autres toxines ≤ LD
			Lot n° 2 : 505,6 µg AO/kg chair 1,2 µg SPX13desMeC/kg chair Autres toxines ≤ LD
			Lot n° 3 : 463,6 µg AO/kg chair 1,4 µg SPX13desMeC/kg chair Autres toxines ≤ LD

* LD: limite de détection.

** Analogue de spirolides, famille de toxines non réglementée.

(2) Genre phytoplanctonique producteur d'acide okadaïque.

Tableau 3. Niveaux de concentration en acide okadaïque et de ses analogues dans le cadre du plan de surveillance 2010

Catégories de coquillages		Concentration AO + DTX* (µg/kg chair) (Données PS 2010)					
		≤ LD**	≥ LD et < LQ***	≥ LQ et < 10 (2LQ)	≥ 10 et < 45	≥ 45 et < 160	≥ 160 Seuil réglementaire
Moules	n = 147	117	9	8	10	2	1
	%	79,6 %	6,1 %	5,4 %	6,8 %	1,4 %	0,7 %
Huîtres	n = 150	140	2	4	4	0	0
	%	93,3 %	1,3 %	2,7 %	2,7 %	0,0 %	0,0 %
Coquilles St-Jacques	n = 132	130	1	1	0	0	0
	%	98,5 %	0,8 %	0,8 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %
Autres bivalves	n = 18	16	1	1	0	0	0
	%	88,9 %	5,6 %	5,6 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %

* Acide okadaïque et analogues. ** LD : limite de détection. *** LQ : limite de quantification.

a permis de montrer un lien statistiquement significatif entre la consommation de moules et les symptômes observés. Les résultats d'analyses effectuées au LNR, associés à l'enquête épidémiologique, ont donc confirmé le lien entre les TIAC et la consommation de moules de Galice. En outre, les mesures prises par les autorités françaises ont été efficaces car aucune TIAC n'a été signalée après le retrait de vente de ces produits.

Aucun des 145 échantillons analysés dans le cadre des autocontrôles n'a été trouvé supérieur aux seuils de salubrité.

Conclusion

Le bilan de cette première année de surveillance officielle des toxines lipophiles par LC-MS/MS montre que le nombre d'échantillons mis sur le marché présentant un niveau de toxines supérieur aux seuils de salubrité ou ayant été prouvé comme responsable d'une TIAC est resté stable par rapport aux années précédentes où le bioessai était utilisé dans le cadre de la surveillance officielle. Les résultats obtenus par le LNR au travers des analyses du PS de la DGAL ainsi que des analyses de TIAC montrent que le dispositif national de surveillance, basé sur un premier niveau de surveillance des zones de production par l'Ifremer et sur un second niveau de surveillance de l'ensemble des produits mis sur le marché (origine nationale ou non), apporte un niveau élevé de protection du consommateur. En effet, sur l'échantillonnage du PS (447 échantillons analysés), un seul échantillon prélevé au stade de la mise sur le marché (0,2 %) s'est révélé contenir des toxines à un niveau supérieur au seuil de salubrité. D'autre part, le nombre d'échantillons impliqués dans des cas confirmés de TIAC est faible (3/15 échantillons) et stable par rapport aux années précédentes. Enfin, aucun échantillon de coquillages français n'a été impliqué dans des cas de TIAC confirmant l'efficacité du dispositif national de surveillance et en particulier de la surveillance en amont des zones de production.

Par ailleurs, il est important de noter que le bio-essai sur souris reste utilisé en France dans deux domaines.

Une fois par mois, dans le cadre du dispositif complémentaire de vigilance [7] mis en place au niveau national, dix échantillons de moules provenant de dix points de référence situés le long du littoral français, sont analysés par le bio-essai sur souris en complément de l'analyse chimique et de l'examen du phytoplancton dans l'eau. L'objectif est de pouvoir détecter l'apparition d'une nouvelle toxine non recherchée par la méthode LC-MS/MS.

Le bio-essai souris reste également la méthode de détection officielle pour les analyses de toxines de la famille de la STX (PSP, *paralytic shellfish poisoning*) dans les coquillages.

Enfin, en 2011, le LNR continuera à réaliser les analyses des toxines lipophiles du PS, des TIAC ainsi que des autocontrôles. Au cours de l'année 2012, ces analyses seront transférées à un réseau de laboratoires agréés pour ces analyses.

Remerciements

Les auteurs remercient chaleureusement Céline Alvès, Mylène Benoit, Sarah El Ksiri et Vincent Hort pour leur contribution importante à ce travail.

Références bibliographiques

- [1] EU-Harmonised Standard Operating Procedure for determination of Lipophilic marine biotoxins in molluscs by LC-MS/MS http://www.aesan.msps.es/en/CRLMB/web/procedimientos_crlmb/crlmb_standard_operating_procedures.shtml
- [2] Règlement (CE) n° 15/2011 de la Commission du 10 janvier 2011 amendant le règlement n° 2074/2005. *Journal officiel de l'Union européenne*, L6:3-6.
- [3] Règlement (CE) n°853/2004 du parlement européen et du conseil du 29 avril 2004 fixant des règles spécifiques d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale. *Journal officiel de l'Union européenne* L139:55
- [4] Krysz S., Hossen V., Trotereau S., Biré R. (2010). Biotoxines marines lipophiles, évolution des modalités de surveillance des coquillages, mise en place d'une méthode chimique en complément du bio-essai sur souris, *EuroReference*, n°3, ER03-10M01.
- [5] EFSA. 2009. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the european commission on marine biotoxins in shellfish – Summary on regulated marine biotoxins. *The EFSA Journal*, 1306: 1-23.
- [6] Note de service DGAL/SDQA/SDSSA/N2009-8331 du 15 décembre 2009 relative à la mise en oeuvre du plan de surveillance des phycotoxines et des contaminants chimiques dans les mollusques bivalves au titre de l'année 2010.
- [7] Afssa. Saisine 2009-SA-0205 du 4 décembre 2009. Avis relatif au dispositif de surveillance des phycotoxines lipophiles dans les zones conchylicoles concernant la détermination des périodes à risque et des points de référence.