



HAL
open science

Risques pour la santé humaine liés aux proliférations d'*Ostreopsis* spp. sur le littoral basque

Rodolphe Lemee, Jean-François Humbert, Eric Abadie, Zouher Amzil, Elisa Berdalet, Ronel Biré, Marie-Yasmine Dechraoui Bottein, Luc de Haro, Nicolas Delcourt, Valérie Fessard, et al.

► To cite this version:

Rodolphe Lemee, Jean-François Humbert, Eric Abadie, Zouher Amzil, Elisa Berdalet, et al.. Risques pour la santé humaine liés aux proliférations d'*Ostreopsis* spp. sur le littoral basque. Saisine n°2021-SA-0212, Anses. 2023, 244 p. anses-04243710

HAL Id: anses-04243710

<https://anses.hal.science/anses-04243710>

Submitted on 8 Jan 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0
International License

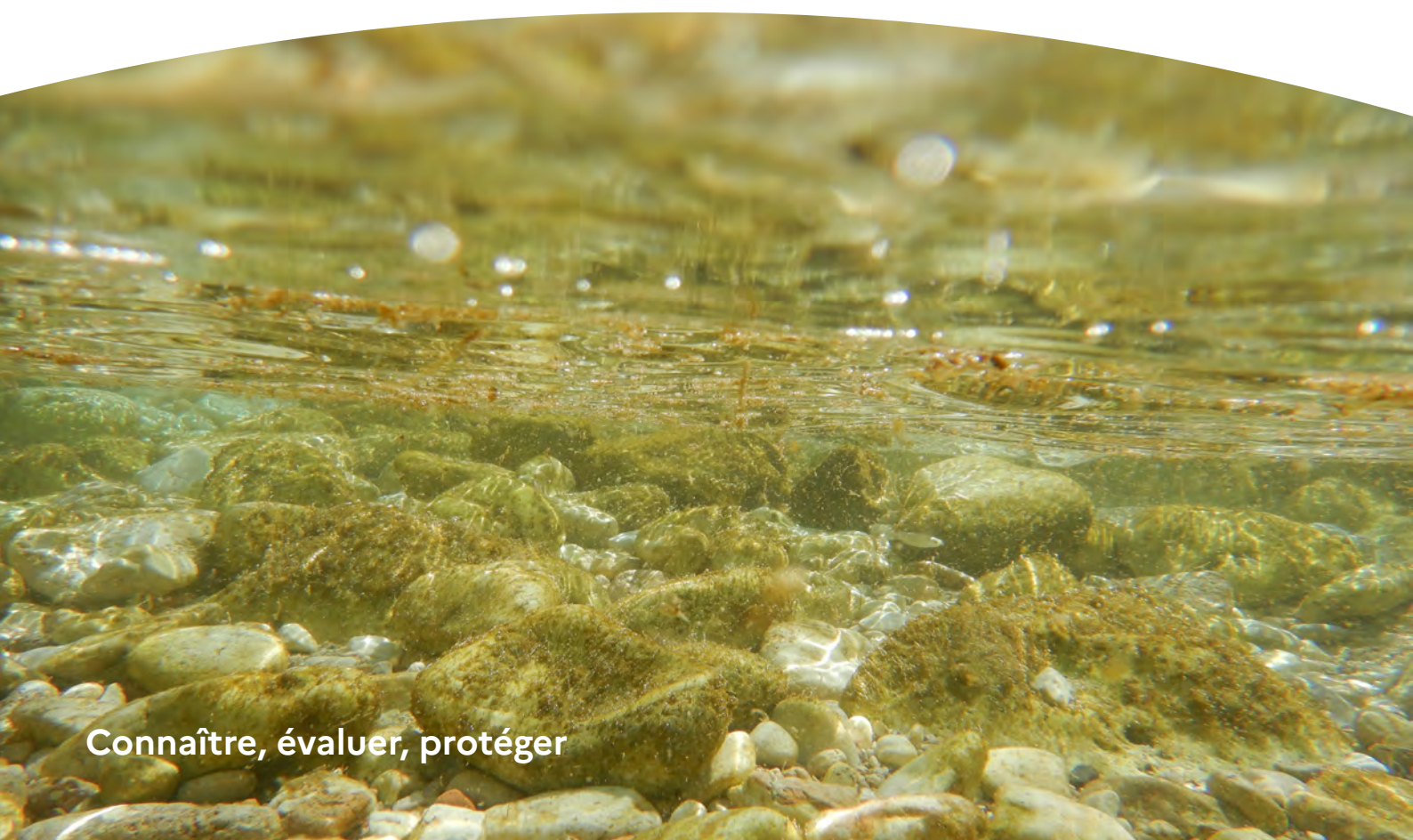


anses

Risques pour la santé humaine liés aux proliférations d'*Ostreopsis* spp. sur le littoral basque

Avis révisé de l'Anses
Rapport d'expertise collective

Juillet 2023



Connaître, évaluer, protéger

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 31 juillet 2023

AVIS RÉVISÉ¹ **de l'Agence nationale de sécurité sanitaire** **de l'alimentation, de l'environnement et du travail**

relatif aux risques pour la santé humaine liés aux proliférations **d'*Ostreopsis* spp. sur le littoral basque**

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 3 décembre 2021 par la Direction générale de la santé (DGS) et la Direction générale de l'alimentation (DGAL) pour la réalisation de l'expertise suivante dont le titre initial était : « *demande d'avis relatif aux risques liés aux efflorescences d'*Ostreopsis* spp. sur l'ensemble du littoral français* ».

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

1.1. Contexte

Au cours des dernières décennies, plusieurs espèces de dinoflagellés du genre *Ostreopsis* ont été identifiées dans les eaux marines de pays européens tels que l'Albanie, la Croatie, Chypre, l'Espagne, la France, la Grèce, l'Italie, Monaco et le Portugal (Ciminiello *et al.*, 2006 ; Aligizaki *et al.*, 2008 ; Amzil *et al.*, 2012 ; Del Favero *et al.*, 2012; Funari, Manganelli et Testai, 2015 ; Accoroni et Totti, 2016; Fraga *et al.*, 2017 ; dos Santos *et al.*, 2019). Ces microalgues peuvent causer des intoxications humaines lorsque les cellules ou les toxines qu'elles produisent sont présentes dans l'eau de mer, les aérosols ou dans certains produits de la mer

¹ Annule et remplace l'avis du 12 mai 2023

(Pelin *et al.*, 2016b ; Walsh, 2017 ; Patocka *et al.*, 2018). La voie principale d'exposition de l'Homme est l'inhalation d'aérosols sans que l'on sache actuellement si les agents à l'origine des intoxications sont les cellules d'*Ostreopsis*, les débris cellulaires, des toxines connues produites par *Ostreopsis* ou d'autres composés non encore identifiés. D'autres voies d'exposition (contact cutané, contact oculaire, ingestion d'eau ou de produits de la mer contaminés) sont possibles (Paradis et Labadie, 2022).

Les intoxications se manifestent par divers signes et symptômes (survenant moins de 48h après l'exposition) :

- neurosensoriels et neurologiques : paresthésies (sensation de fourmillements), dysesthésies (sensation de brûlure) et céphalées ;
- respiratoires, de la sphère ORL et stomatologiques : dysgueusie à type de goût métallique, rhinorrhée, toux, gêne respiratoire ;
- cutanés évoquant de l'urticaire ;
- cardiaques : tachycardie, poussée hypertensive ;
- digestifs : nausées, vomissements, diarrhée ;
- systémiques : fièvre ;
- locomoteurs : myalgies et arthralgies (douleurs musculaires et articulaires).

Elles surviennent lors de diverses situations :

- travail ou activités récréatives dans la mer (baigneurs, maîtres-nageurs, pêcheurs professionnels, surfeurs, *etc.*) ;
- travail ou activités récréatives sur ou à proximité de la plage (estivants, secouristes, agents en charge du nettoyage des plages, restaurateurs, *etc.*) ;
- séjour ou résidence à proximité immédiate du bord de mer ;
- consommation de produits de la mer contaminés.

En France, la présence d'*Ostreopsis* est identifiée de façon récurrente sur les côtes méditerranéennes depuis une quinzaine d'années (Mangialajo *et al.*, 2011 ; Gémin *et al.*, 2020a) alors qu'elle est beaucoup plus récente sur les côtes basques française et espagnole (Amzil *et al.*, 2021 ; Drouet, 2021 ; Chomérat, 2022). Deux espèces ont été identifiées sur la côte basque : *O. cf. siamensis* et *O. cf. ovata* (Amzil *et al.*, 2021). Si la première, *O. cf. siamensis*, est observée sur cette côte depuis 2018, la seconde, *O. cf. ovata*, a été observée dans cette partie du golfe de Gascogne pour la première fois en 2021.

Le bilan épidémiologique montre que 674 personnes ont développé des signes et des symptômes associés aux proliférations d'*Ostreopsis* sur la côte basque française durant l'été 2021 (Paradis et Labadie 2022). Ce bilan montre par ailleurs qu'il n'existe pas de différence clinique avec les effets observés lors des épisodes de prolifération d'*Ostreopsis cf. ovata* du pourtour méditerranéen.

1.2. Objet de la saisine

Dans son courrier de saisine (cf annexe 2), la DGS et la DGAL ont demandé à l'Anses, dans le cadre de la présente expertise, de mettre à jour les connaissances relatives à *Ostreopsis* qui avaient fait l'objet d'avis de l'Agence en 2007 et 2008 (Anses, 2007 et 2008) et d'établir des recommandations spécifiques à la côte atlantique. Il a également été demandé, si cela

s'avère opportun, de mettre à jour les recommandations spécifiques à la côte méditerranéenne établies en 2007-2008. Cette saisine porte sur les risques sanitaires liés aux diverses voies d'exposition : par inhalation (exposition aux aérosols), par ingestion (consommation de produits de la mer contaminés ou d'eau lors de la pratique d'activités aquatiques) ou suite à un contact cutané ou oculaire, tout en prenant en considération les particularités liées à la protection des travailleurs concernés.

Dans le cadre du contrat d'expertise établi le 20 décembre 2021, l'Agence a redéfini le périmètre de la saisine, reformulé les questions et modifié le titre de cette dernière afin de se focaliser sur les risques liés à la présence d'*Ostreopsis* sur la côte basque.

Ainsi, l'expertise a été réalisée selon deux axes, un premier concernant le bilan des connaissances et un second relatif à l'élaboration de recommandations, détaillés comme suit :

1- Etat des connaissances :

- Description des espèces du genre *Ostreopsis* ;
- Identification et description des toxines associées ;
- Écologie du genre *Ostreopsis* (conditions favorables à la prolifération d'*Ostreopsis* et conditions associées à la production de toxines) ;
- Présence d'*Ostreopsis* sur les côtes françaises métropolitaines et si possible ultramarines (établissement d'une cartographie avec les données du RePHY et/ou les données issues de projets de recherche) ;
- Métrologie du genre *Ostreopsis* et des toxines associées dans l'eau, l'air et les coquillages et sur les macroalgues (description des méthodes de prélèvement et d'analyse, y compris les méthodes de détection rapide) ;
- Voies d'exposition - populations exposées aux cellules d'*Ostreopsis* et aux toxines associées et populations sensibles ;
- Description de programmes de surveillance, de norme ou de réglementation relatifs à *Ostreopsis* à l'international dans l'eau, l'air et les coquillages ;
- Description du programme de surveillance en Méditerranée ;
- Données de toxicité selon les toxines identifiées et les voies d'exposition (éléments de réponse à la question : l'intoxication humaine est-elle liée aux toxines et/ou aux cellules ?) ;
- Exploitation des données épidémiologiques issues des centres antipoison et de toxicovigilance (CAP-TV) (épisode de l'été 2021 et épisodes précédents sur les côtes méditerranéennes).

2- Recommandations établies en fonction du bilan de l'état des connaissances :

- Proposition de valeur toxicologique aiguë et subchronique pour les voies orale/respiratoire/cutanée pour la toxine de référence ;
- Proposition d'un seuil de concentration d'*Ostreopsis* et/ou de toxines dans l'eau ou sur des macroalgues et/ou dans l'air et/ou dans les coquillages à ne pas dépasser ? Le seuil est-il différent en fonction des espèces du genre *Ostreopsis* ?
- Proposition de mesures/investigations complémentaires en cas de dépassement du seuil ;
- Recommandations pour la stratégie d'échantillonnage et de méthodes adaptées pour le prélèvement et l'analyse des cellules et/ou des toxines associées selon les matrices (eau, macroalgues, produits de la mer, embruns) ;

- Recommandations pour la surveillance d'*Ostreopsis* sur la côte basque (points de prélèvements, type de support (eau, macroalgues, autres), fréquence, etc.). Est-il possible d'identifier des zones / périodes à risque sur la côte basque / atlantique ?
- Eléments de réponse à la question : quels sont les risques pour les différents usagers de la mer selon les différentes voies d'exposition (alimentaire, activités aquatiques, embruns) ?
- Préconisations spécifiques pour les professionnels et la ou les population(s) sensible(s) (asthmatiques, etc.).

Le rapport d'expertise du GT, daté de juin 2023, expose l'intégralité des travaux qu'il a réalisés. Cet avis en présente la synthèse pour aider en particulier à la mise en œuvre, dès la saison estivale 2023, d'une surveillance d'*Ostreopsis* sur la côte basque. Sont ainsi présentés au chapitre 3, en complément du bilan des connaissances, les principaux résultats de l'expertise appuyant les recommandations relatives à la surveillance d'*Ostreopsis* sur la côte basque :

- Proposition de stratégie de surveillance d'*Ostreopsis* ;
- Proposition de valeur guide en toxines d'*Ostreopsis* dans les coquillages ;
- Préconisation pour limiter l'exposition des professionnels et des riverains ;
- Proposition d'un outil d'aide la décision pour la gestion des proliférations d'*Ostreopsis*.

Par ailleurs, la liste des besoins de recherche est présentée en annexe 3.

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) ».

2.1. Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

L'expertise relève du domaine de compétence des comités d'experts spécialisés (CES) « Eaux », « Évaluation des risques physico-chimiques dans les aliments » (ERCA) et « Valeurs sanitaires de références » (VSR).

L'Anses a confié l'instruction de cette saisine au groupe de travail (GT) « *Ostreopsis* », créé après un appel public à candidatures, rattaché au comité d'experts spécialisé (CES) « Eaux ». Les travaux d'expertise du GT « *Ostreopsis* » ont été soumis régulièrement au CES « Eaux », (tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques), les 10 mai, 7 juin et 6 décembre 2022 et les 7 mars et 4 avril 2023, ainsi qu'au CES « ERCA », les 11 janvier, 12 mai et 2 juin 2022 et les 13 janvier, 7 février et 14 mars 2023. Le CES « VSR » s'est vu confier la construction de deux VTR pour la palytoxine pour une exposition aiguë et une exposition répétée par voie orale. Les travaux ont été présentés le 19 janvier 2023 et validés le 9 mars 2023. Ils ont fait l'objet d'un avis spécifique de l'Agence publié en juin 2023 (Anses, 2023).

Le rapport d'expertise collective ainsi que le chapitre « Analyse et conclusions » des experts produits par le groupe de travail « *Ostreopsis* » tiennent compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres des CES « EAUX » et « ERCA ». Les sections relatives à l'eau et aux aérosols du présent avis ont été adoptées par le CES « Eaux » le 4 avril 2023, les sections relatives aux produits de la mer ont été adoptées par le CES « ERCA » le 14 mars 2023.

Le présent avis, qui se fonde sur le rapport d'expertise et les conclusions du GT « *Ostreopsis* », a été adopté par le CES « Eaux » lors de sa séance du 4 avril 2023.

La présente révision résulte de modifications éditoriales pour accompagner la publication du rapport, désormais finalisé, et d'une modification sur le dénombrement de cas. L'annexe 4 du présent avis rend compte des évolutions apportées à l'occasion de cette révision.

2.2. Prévention des risques de conflits d'intérêts

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

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

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

2.3. Méthode d'expertise

Pour répondre aux questions de la saisine, le GT « *Ostreopsis* » s'est basé sur une revue approfondie de la littérature (de type « scoping review »). Des auditions ont également été conduites auprès d'acteurs locaux (scientifiques, gestionnaires, médecins).

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GT « *OSTREOPSIS* » ET DU CES « EAUX »

3.1. Bilan des connaissances : synthèse de l'analyse de la revue bibliographique

3.1.1. Description

Les organismes unicellulaires du genre *Ostreopsis* sont des microalgues de la classe des Dinophycées d'environ 40 à 100 µm de longueur et possédant deux flagelles. Ils ont la forme d'une lentille plus ou moins aplatie et le genre est facilement reconnaissable avec un microscope optique.

Il existe 12 espèces du genre *Ostreopsis* décrites à ce jour. La proximité morphologique de certaines espèces, associée à la variabilité morphologique au sein d'une même espèce, compliquent les études et rendent l'identification génétique indispensable.

Les études de biologie moléculaire suggèrent la présence d'autres espèces (nommées espèces cryptiques). Le terme « cf. » (*confer* en latin) utilisé largement dans l'ensemble du texte pour *Ostreopsis* cf. *ovata* et *Ostreopsis* cf. *siamensis* précise que ces espèces ressemblent morphologiquement à *Ostreopsis ovata* et *Ostreopsis siamensis*, mais que les données de biologie moléculaire sont absentes ou trop parcellaires pour confirmer qu'il s'agit bien de ces espèces.

3.1.2. Biologie et écologie du genre *Ostreopsis*

Les espèces du genre *Ostreopsis* se développent sous forme de biofilms, sur des substrats biotiques (macrophytes), ou abiotiques (rochers/galets), généralement dans des zones peu profondes et relativement abritées des vents et des courants (Mangialajo *et al.*, 2011). La production d'une matrice mucilagineuse (mucus) permet l'agrégation des cellules et la

formation du biofilm (Honsell *et al.*, 2011 ; Escalera *et al.*, 2014). Lorsque les conditions environnementales sont favorables à la croissance cellulaire, *O. cf. ovata* prolifère, avec des abondances cellulaires pouvant dépasser le million de cellules par gramme de poids frais de macroalgue (Mangialajo *et al.*, 2008 ; Audition Ifremer 2022). Différents processus (biologiques ou physiques, comme la houle et les courants) peuvent provoquer le détachement de cellules ou d'agrégats de cellules du substrat, puis leur dispersion dans la colonne d'eau. On parle alors de phase planctonique de ces microalgues. Les agrégats peuvent s'accumuler en surface pour former des fleurs d'eau visibles à l'œil nu (Mangialajo *et al.*, 2011 ; Pavaux *et al.*, 2021).

Ostreopsis a longtemps été considéré comme un genre se développant uniquement dans les zones tropicales et subtropicales. Or, depuis le début des années 2000, *Ostreopsis* est de plus en plus fréquemment observé dans les zones tempérées, comme la Méditerranée. Depuis sa première identification en France, à Villefranche-sur-Mer en 1972 (Taylor, 1979), la présence du genre *Ostreopsis* a été signalée sur tout le pourtour méditerranéen (Tognetto *et al.*, 1995 ; Vila *et al.*, 2001 ; Aligizaki et Nikolaidis, 2006 ; Turki *et al.*, 2006 ; Mangialajo *et al.*, 2008 ; Accoroni *et al.*, 2011 ; Illoul *et al.*, 2012 ; Amzil *et al.*, 2012 ; Accoroni *et al.*, 2016). *Ostreopsis cf. ovata* est l'espèce la plus répandue en Méditerranée, notamment dans la partie nord occidentale, tandis que *O. cf. siamensis* et *O. fattorussoi* ont surtout été observées respectivement en Méditerranée occidentale (Espagne, Tunisie, Italie) et orientale (Chypre, Liban) (Battocchi *et al.*, 2010 ; Accoroni et Totti, 2016 ; Accoroni *et al.*, 2016).

Les côtes basques françaises et espagnoles constituent ces dernières années une nouvelle zone de développement d'*Ostreopsis* (Amorim *et al.*, 2010 ; Laza-Martinez *et al.*, 2011 ; Drouet, 2021 ; Chomerat, 2022). Les espèces retrouvées dans ces zones sont *O. cf. ovata* et *O. cf. siamensis*. Ce nouvel habitat pour *Ostreopsis* montre que ce genre est capable de s'adapter à des conditions environnementales différentes de celles du pourtour méditerranéen. Les eaux du littoral aquitain sont en effet plus froides, moins salées et elles présentent un fort hydrodynamisme causé, en partie, par les marées. Ces caractéristiques sont, *a priori*, moins favorables au développement d'*O. cf. ovata* que les eaux plus chaudes et plus stratifiées de la Méditerranée. En revanche, l'abondance de macroalgues sur substrats rocheux sur la côte basque est favorable au développement des biofilms d'*Ostreopsis*.

3.1.3. Toxines produites

Certaines espèces d'*Ostreopsis* produisent des composés pouvant présenter un danger pour la santé humaine ainsi que pour la faune et la flore marines. La majorité des toxines produites par les espèces d'*Ostreopsis* sont la palytoxine isobare (isob-PLTX)², les ovatoxines (OVTX–a à -i), les ostréococines (OST) et les mascarénotoxines. Ces composés sont identifiés dans ce document comme « les toxines du groupe de la PLTX » car elles présentent toutes une structure chimique proche de celle de la PLTX. Historiquement, la PLTX a été mise en évidence dans un corail tropical mou d'Hawaï (*Palythoa toxica*). Elle est à l'origine d'intoxications humaines développées suite à la manipulation de plusieurs genres de corail mou en aquarium (Calon *et al.*, 2019). Il est à noter que les microalgues du genre *Ostreopsis* peuvent produire de l'isob-PLTX mais pas de la PLTX.

Les profils toxiques de souches d'*O. cf. ovata* isolées en Méditerranée ont montré la présence de plusieurs analogues d'ovatoxines (OVTX) (Ciminiello *et al.* 2010 ; Tartaglione *et*

² Il s'agit d'un isomère de la PLTX, de même formule brute mais ayant une formule développée différente.

al., 2017). Ces mêmes toxines ont également été détectées dans un échantillon prélevé lors de l'épisode de prolifération d'*Ostreopsis* d'août 2021 sur la côte basque et dans des cellules d'*O. cf. ovata* mises en culture suite à l'isolement de souches issues du même prélèvement (Amzil *et al.*, 2021, Chomérat *et al.*, 2022). En revanche, aucune toxine du groupe de la PLTX n'a été retrouvée dans les cellules d'*O. cf. siamensis* isolées à partir de ce même prélèvement, ce qui confirme les résultats d'études antérieures menées sur plusieurs souches d'*O. cf. siamensis* provenant de Méditerranée (Sicile, Italie) et d'Atlantique (Sines et Cascais, Portugal) (Ciminiello *et al.*, 2013). Aucune OST ni mascalénotoxine n'a été retrouvée dans les souches d'*O. cf. siamensis* et d'*O. cf. ovata* isolées des côtes méditerranéenne et basque (Ciminiello *et al.*, 2006 ; Tartaglione *et al.*, 2017 ; Chomérat *et al.*, 2022).

Par ailleurs, certaines souches d'*Ostreopsis* produisent des composés n'appartenant pas aux toxines du groupe de la PLTX, et potentiellement toxiques pour les humains, la faune et la flore marines. C'est le cas notamment de souches coréennes et méditerranéennes d'*O. cf. ovata* qui peuvent produire des ostréols, des ostréotoxines, des liguriatoxines et riviératoxines (pour ces deux dernières familles de molécules, les structures sont encore inconnues).

À ce jour, les OVTX sont les seules toxines du groupe de la PLTX produites par les espèces d'*Ostreopsis* proliférant sur la côte basque qui ont pu être identifiées.

3.1.4. Toxicité

Les études portant sur les toxines produites par *Ostreopsis* (toxines du groupe de la PLTX ainsi que les autres toxines) sont très parcellaires. En raison de la disponibilité de plusieurs études *in vivo* avec la PLTX et compte tenu de la grande similarité de structure entre la PLTX et les toxines du groupe de la PLTX, le GT « *Ostreopsis* » a choisi d'utiliser la PLTX comme une molécule représentative des toxines du groupe de la PLTX (proxy) :

Les études disponibles pour la PLTX concernent principalement l'exposition par voie orale alors que celles par inhalation ou par contact cutané ont fait l'objet de moins de travaux.

Palytoxine

Il n'existe pas de données permettant d'établir des paramètres toxico-cinétiques de la PLTX. **La toxicité aiguë** de la PLTX a été étudiée chez de nombreuses espèces animales (très majoritairement des rongeurs, mais également des lagomorphes, des chiens et des singes) et cela pour plusieurs voies d'administration. Elles montrent que la mortalité des animaux après gavage apparaît à des doses jusqu'à 15 000 fois plus élevées que l'administration par inhalation ou par injection (intraveineuse, intrapéritonéale, intramusculaire) (Boente-Juncal *et al.*, 2020a ; Poli *et al.*, 2018 ; Tubaro *et al.*, 2011 ; Sosa *et al.*, 2009).

La cinétique d'apparition, la nature et l'intensité des signes et symptômes peuvent différer en fonction de la voie d'administration considérée. Au cours des études de toxicité aiguë par administration orale citées précédemment, une mortalité rapide (en quelques heures) a été observée pour les doses les plus élevées. Elle est consécutive à des effets neurotoxiques avec paralysie musculaire et détresse respiratoire. Pour des doses plus faibles ne provoquant pas de mortalité rapide, des lésions sont observées aux sites de contact en fonction de la voie d'exposition (cavité nasale, poumon, peau, estomac, intestin) ainsi qu'au niveau systémique (cœur, foie, reins, tissus lymphoïdes, glandes salivaires), signalant une distribution très importante de la toxine au sein de l'organisme. Ces atteintes multiples s'expliquent selon toute vraisemblance par le fait que la PLTX agit sur une protéine de transport transmembranaire

(Na/K-ATPase) (Takeuchi *et al.*, 2009 ; Scheiner-Bobis *et al.*, 2002) qui est présente dans tous les types cellulaires (Mobasheri *et al.*, 2000).

Les études **de toxicité répétée pendant 7 ou 28 jours** par administration orale montrent que, si des organes comme les poumons, le cœur et la rate sont altérés pour les doses les plus élevées, seuls l'estomac, les intestins et le foie le sont aux doses plus faibles (Del Favero *et al.*, 2013 ; Boente-Juncal *et al.*, 2020b).

Considérant l'insuffisance des données d'intoxications humaines et animales (Wiles *et al.*, 1974 ; Fujiki *et al.*, 1986 ; Poli *et al.*, 2018), **aucune VTR pour une exposition court terme par inhalation ou contact cutané à la PLTX n'a pu être proposée.**

Les symptômes observés à la suite d'une exposition aiguë à la PLTX par voie orale (gavage) chez la souris sont une piloérection, une léthargie, une ataxie, des douleurs abdominales et une dyspnée. **Une VTR aiguë par voie orale de 0,08 µg PLTX.kg⁻¹ pc** a été élaborée par le CES VSR, sur la base d'un NOAEL³ dérivé à partir de l'étude de Boente-Juncal *et al.* (2020a). **Cette valeur est associée à un indice de confiance⁴ moyen-faible (Anses, 2023- en cours de finalisation).**

Ovatoxines

Contrairement aux études de toxicité de la PLTX, celles relatives aux OVTX sont rares en raison de la difficulté d'obtention de ces toxines pures (Gémin, 2020b).

Une seule étude *in vivo* de toxicité aiguë a été conduite avec l'OVTX-a (Poli *et al.*, 2018). Elle montre que l'exposition de rats par inhalation entraîne des altérations de la cavité nasale ainsi que des lésions au niveau pulmonaire, cardiaque, hépatique et rénal alors que peu ou aucun effet n'a été constaté au niveau musculaire et gastro-intestinal. Au vu des données disponibles, les doses induisant la mortalité et les symptômes et lésions observés apparaissent très similaires entre la PLTX et l'OVTX-a. **L'ensemble des résultats obtenus par des études *in vivo* et *in vitro* suggère que** les mécanismes cellulaires d'action de la PLTX et de l'OVTX-a sont très proches.

Autres toxines identifiées

Seules des données de toxicité aiguë sont disponibles pour l'OST-D par diverses voies d'administration. Les effets rapportés sont assez similaires à ceux de la PLTX.

Les données concernant les autres toxines connues sont très parcellaires avec majoritairement des études *in vitro*.

Pour ces raisons, **il n'a pas été possible d'établir de VTR pour toutes ces autres toxines.**

Du fait de la similarité des effets induits par la PLTX, les OVTX ou l'OST-D chez l'animal, le GT « *Ostreopsis* » estime que la VTR aiguë élaborée pour l'exposition par voie orale à la PLTX s'applique à la somme non pondérée des doses d'exposition (sous l'hypothèse d'une équivalence toxique rapportée au poids corporel).

³ Le NOAEL (*non observed adverse effect level*) ou dose sans effet nocif observable, est la dose la plus élevée d'une substance chimique ne produisant aucun effet nocif observable au cours d'une étude de toxicité.

⁴ L'Anses attribue un niveau de confiance global à chaque VTR en prenant en compte la nature et la qualité des données, l'effet critique et son mode d'action, le choix de l'étude clé, le choix de la dose critique. Pour chaque critère, un niveau de confiance fort, moyen ou faible doit être fixé et en combinant les niveaux de chaque critère, un niveau de confiance global est déterminé par avis d'experts (Anses, 2017). Cinq niveaux de confiance correspondant à cinq couleurs sont possibles : **fort (vert foncé), moyen-fort (vert clair), moyen (jaune), moyen-faible (orange) ou faible (rouge).**

3.1.5. Contamination des milieux par les toxines d'*Ostreopsis*

Ce paragraphe présente l'état des connaissances relatives aux données de contamination de l'eau, des aérosols et des produits de la mer par les toxines produites lors des épisodes de prolifération d'*Ostreopsis*.

Pour rappel, il a été montré que les souches d'*Ostreopsis* cf. *ovata* présentes sur la côte basque durant les étés 2021 et 2022, produisent des OVTX.

Eaux

La contamination de l'eau de mer par les toxines d'*Ostreopsis* est peu documentée. Les expérimentations menées en laboratoire montrent que les OVTX produites par les cellules d'*Ostreopsis* (toxines intracellulaires) peuvent se retrouver dans l'eau ou dans le mucus (toxines extracellulaires). Cette distribution en deux fractions (intracellulaire et extracellulaire) des OVTX impacte la biodisponibilité des toxines et donc les niveaux potentiels d'exposition de la population. La concentration intracellulaire en OVTX est très variable d'une zone géographique à l'autre, avec un minima de l'ordre de 10^{-3} pg.cell⁻¹ sur les côtes atlantiques (Maroc, Pays Basque) et un maximum de 75 pg.cell⁻¹ sur les côtes méditerranéennes (mer Adriatique) (Alkhatib et al., 2022 ; Chomerat et al., 2022). Différents facteurs et processus biotiques et abiotiques, comme la nature du substrat, la phase de croissance, la présence de compétiteurs, la disponibilité en nutriments et/ou la température, sont susceptibles de contribuer à cette variabilité.

La mesure des concentrations en OVTX extracellulaires est limitée par l'absence de méthode optimisée pour l'extraction de ces toxines de l'eau de mer. Ainsi, aucune donnée de concentration en OVTX dans la colonne d'eau ou dans le mucus en milieu naturel n'est actuellement disponible. Pour ces mêmes raisons, aucune donnée de contamination de l'eau ou du mucus par les autres toxines produites par *Ostreopsis* n'est disponible à ce jour.

Le GT « *Ostreopsis* » estime qu'en l'absence de données suffisantes, il n'est pas possible d'exclure le risque d'exposition par ingestion ou par contact cutané et oculaire d'eau contaminée par des toxines du groupe de la PLTX, en cas de prolifération d'*Ostreopsis*.

Aérosols

La nature des composés aérosolisés toxiques pour les populations humaines n'est pas encore clairement identifiée. La toxicité des aérosols produits lors des proliférations d'*Ostreopsis* pourrait résulter de la présence en leur sein des toxines du groupe de la PLTX, des autres toxines citées précédemment, de cellules ou débris cellulaires d'*Ostreopsis*, ou bien encore d'autres composés encore inconnus.

Seules des données parcellaires de contamination des aérosols par les OVTX sont actuellement disponibles. Quelques études de terrain et de laboratoire montrent que les OVTX peuvent être aérosolisées. L'enrichissement des aérosols en matériel toxique serait en partie dépendant de l'abondance cellulaire d'*Ostreopsis* dans la couche de surface de la colonne d'eau, mais surtout des conditions météorologiques (vitesse du vent). Néanmoins, aucune donnée ne permet de déterminer si les OVTX transférées depuis la colonne d'eau sont dissoutes ou associées à des débris cellulaires d'*Ostreopsis*.

Malgré l'absence de connaissances suffisantes relatives à la nature des composés toxiques et des processus à l'origine de leur transfert vers l'atmosphère, les experts du GT « *Ostreopsis* » confirment que la voie principale d'exposition de l'Homme est l'inhalation même si les experts ne sont pas en mesure, pour l'instant, de caractériser et d'évaluer le risque lié aux proliférations d'*Ostreopsis* par cette voie d'exposition.

Produits de la mer

La contamination de produits de la mer par des toxines du groupe de la PLTX, produites par *Ostreopsis*, a été observée dans de nombreux pays, en particulier sur le pourtour méditerranéen. Parmi les organismes contaminés, les herbivores présentent généralement les concentrations les plus élevées en toxines, sans doute parce qu'ils broutent directement les macroalgues sur lesquelles prolifèrent les cellules d'*Ostreopsis*. La plus grande partie des toxines se trouve dans les glandes digestives des moules et dans le tube digestif d'autres organismes (oursins, céphalopodes, poissons), avec une dominance d'OVTX (au moins 90%) et une faible proportion de (isob-)PLTX (environ 10%). Bien que les profils d'OVTX puissent varier selon les organismes, les rares données disponibles indiquent que l'OVTX-a est majoritaire puisqu'elle représente environ 70% du profil toxinique, suivie par l'OVTX-b (20-30%), puis par les OVTX-c et -e (0-10%). L'accumulation de toxines du groupe de la PLTX dans les oursins et les moules est souvent corrélée avec les abondances cellulaires *in situ* d'*O. cf. ovata*. Si (1) la récolte des oursins est interdite en période estivale en Méditerranée et (2) les parties comestibles des oursins sont (*a priori*) les gonades, une préoccupation sanitaire ne peut pas être exclue pour les personnes mal informées ou consommant tout ou une partie du contenu du tube digestif de ces animaux.

L'une des limites majeures de ce bilan des connaissances sur les données d'occurrence et de quantification des toxines dans les produits de la mer est la faible qualité des données disponibles. En effet, dans un grand nombre d'études, les techniques analytiques utilisées ne permettent ni d'identifier de manière non équivoque, ni de quantifier de manière robuste (reproductibilité et justesse) les toxines du groupe de la PLTX, d'autant que seul un étalon analytique de la PLTX isolée du corail *Palythoa* est commercialement disponible à ce jour. Par ailleurs, les unités de mesure dans les produits de la mer n'étant pas harmonisées, il est souvent difficile de comparer les données issues des différentes études. La qualité des données est une condition primordiale pour l'évaluation des risques.

De rares cas d'intoxication humaine ont été associés à la consommation de produits de la mer (crabes, poissons) contaminés par *Ostreopsis* aux Philippines et à Madagascar. Cependant, les méthodes analytiques utilisées (bioessais) ne permettraient pas de les attribuer de manière certaine à la présence de toxines du groupe de la PLTX produites par *Ostreopsis*.

Le GT « *Ostreopsis* » estime qu'en l'absence de données suffisantes, il n'est pas possible d'exclure le risque d'exposition par voie orale lié à la consommation de produits de la mer contaminés par des toxines du groupe de la PLTX, surtout pour les organismes consommés non éviscérés.

3.2. Recommandations pour la surveillance d'*Ostreopsis* et de ses toxines, ainsi que pour la prévention des dangers liés à ses proliférations

Devant l'absence de certitude que les OVTX produites par *O. cf. ovata* soient à l'origine des intoxications humaines survenues lors des épisodes de prolifération d'*Ostreopsis* sur la côte basque ces deux derniers étés, le GT « *Ostreopsis* » préconise que la surveillance des proliférations d'*Ostreopsis* se limite au suivi des cellules de cette microalgue, sans que celui-ci ne soit associé, pour l'instant, à un suivi des toxines produites par *Ostreopsis* dans l'eau ou dans les aérosols. Cette surveillance sera quantitative pour les compartiments benthique et planctonique et uniquement qualitative pour les fleurs d'eau.

Néanmoins, des recommandations ont été formulées pour prévenir l'exposition aux toxines produites par *Ostreopsis*, en tenant compte de toutes les voies d'exposition.

L'ensemble des recommandations ont été établies à partir des observations, des études menées et des expériences acquises depuis une quinzaine d'années sur le pourtour méditerranéen.

3.2.1. Surveillance d'*Ostreopsis* dans l'eau sur le littoral basque

Stratégie générale de la surveillance d'*Ostreopsis*

Une des difficultés inhérentes à la détection des cellules d'*Ostreopsis* est liée à l'hétérogénéité de leur distribution le long du littoral ainsi qu'à leur distribution spatiale et temporelle dans les compartiments benthique et planctonique. Ces hétérogénéités nécessitent d'optimiser les protocoles de prélèvement des cellules d'*Ostreopsis* dans les différents compartiments afin de pouvoir les quantifier et de proposer des mesures de gestion sanitaire adaptées.

Les observations et les suivis environnementaux ou sanitaires ont montré que les proliférations surviennent en général sur les mêmes sites d'une année à l'autre. **Le GT « *Ostreopsis* » recommande donc que le contrôle sanitaire soit mis en place préférentiellement sur les sites déjà touchés par les proliférations d'*Ostreopsis* sur la côte basque, qu'il s'agisse de plages déjà encadrées par le contrôle sanitaire des eaux de baignade ou de sites de loisirs nautiques très fréquentés dans cette région tout au long de l'année.**

Sachant que l'ADN environnemental d'*Ostreopsis cf. siamensis* a été détecté en différents points de la côte atlantique française (Drouet, 2021) et que *O. cf. siamensis* et *O. cf. ovata* partagent la même niche écologique, l'apparition de nouveaux sites de proliférations ne peut être exclue, ce qui devrait conduire à l'élargissement de la zone de surveillance dans les années à venir à tout le littoral de la Nouvelle-Aquitaine.

En parallèle du contrôle sanitaire des eaux de baignade et des sites de loisirs nautiques, l'apparition des situations citées ci-après, au sein ou hors des zones surveillées dans le cadre de ce contrôle, devrait déclencher la réalisation de prélèvements par l'Agence régionale de santé (ARS) pour confirmer la présence d'*Ostreopsis* dans l'eau et sur les macrophytes :

- l'observation visuelle de fleurs d'eau en surface ;
- le signalement de cas d'intoxications humaines et/ou d'une sensation de goût métallique sans que la personne ne soit nécessairement entrée en contact avec de l'eau.

Période de mise en place de la surveillance d'*Ostreopsis*

La période de surveillance d'*Ostreopsis* préconisée actuellement dans le cadre du contrôle sanitaire des eaux de baignade en Méditerranée est celle du suivi des eaux de baignade (15 juin - 15 septembre). Cependant, le GT « *Ostreopsis* » recommande qu'en fonction des conditions météorologiques, une surveillance plus précoce soit mise en place au niveau de la côte basque. Il a été en effet constaté, en Méditerranée, que la date de début des proliférations d'*Ostreopsis* est dépendante de la somme des anomalies de la température de surface de l'eau de mer au printemps (plus le printemps est chaud, plus la température de l'eau de surface est chaude et plus les proliférations d'*Ostreopsis* sont précoces - Drouet *et al.*, 2022).

En attendant de disposer de données similaires sur la côte basque, le GT « *Ostreopsis* » recommande, de démarrer le contrôle sanitaire d'*Ostreopsis* à partir du 15 mai. La fréquence d'échantillonnage sera adaptée en fonction des abondances d'*Ostreopsis* mesurées, en suivant le logigramme (cf 3.5) proposé par le GT.

Stratégie d'échantillonnage d'*Ostreopsis* pour le contrôle sanitaire

Sachant que le développement des proliférations d'*Ostreopsis* se fait dans un premier temps au niveau du compartiment benthique avant d'alimenter la colonne d'eau, **le GT « *Ostreopsis* » préconise de surveiller l'abondance d'*Ostreopsis* sur les macrophytes, en sus de l'évaluation des abondances d'*Ostreopsis* dans l'eau effectuée dans le cadre du contrôle sanitaire des eaux de baignade.**

Par ailleurs, de fortes variations diurnes des abondances cellulaires ont été mises en évidence sur le pourtour méditerranéen, aussi bien dans les compartiments benthique et planctonique, qu'en surface de la colonne d'eau. Les abondances cellulaires sont plus importantes le matin dans le compartiment benthique, et en fin d'après-midi dans le compartiment planctonique et les fleurs d'eau. En 2022, des variations similaires ont été observées sur la côte basque. Cependant, **dans l'attente de la confirmation d'une même dynamique « colonne d'eau-substrat benthique » sur la côte basque, le GT « *Ostreopsis* » recommande de privilégier les prélèvements en fin d'après-midi, afin d'optimiser l'estimation des abondances planctoniques.** Si une dynamique verticale similaire est confirmée, le GT « *Ostreopsis* » recommande de réaliser, dans la mesure du possible, les prélèvements dans les deux compartiments (planctonique et benthique) aux tranches horaires correspondant aux abondances cellulaires maximales (en Méditerranée : 8h à 10h pour le compartiment benthique, et 16h à 18h pour le compartiment planctonique).

Prélèvement et conservation des cellules d'*Ostreopsis* planctoniques et des fleurs d'eau

En l'absence de méthode normalisée pour prélever les cellules d'*Ostreopsis* dans le compartiment planctonique, et dans l'objectif d'une harmonisation des pratiques de prélèvement, le GT « *Ostreopsis* » préconise le prélèvement d'un échantillon composite dans la zone de baignade et sur les lieux de pratique d'activités nautiques. Cet échantillon correspond, pour une zone d'environ un mètre de profondeur, au mélange de prélèvements d'eau effectués en trois points, régulièrement répartis dans la zone suivie. En chaque point d'échantillonnage, le prélèvement doit être réalisé entre la surface et 20 à 50 cm de profondeur. Les trois prélèvements sont ensuite mélangés, à volumes égaux, dans un récipient de type seau (préalablement rincé trois fois avec l'eau du milieu) dans lequel sera prélevé

(juste après le mélange) l'échantillon final à analyser (juste après le mélange). Cet échantillon servira à l'identification et au dénombrement des cellules d'*Ostreopsis*.

Pour optimiser et harmoniser les pratiques de prélèvement, le GT « *Ostreopsis* » recommande d'utiliser des flacons en plastique d'une contenance de 250 mL au minimum pour recueillir l'échantillon destiné à l'identification et au dénombrement des cellules d'*Ostreopsis*. Ils seront remplis aux deux-tiers pour permettre un bon mélange par agitation. L'échantillon devra être ensuite fixé au lugol acide (1% volume/volume) dans l'heure qui suit le prélèvement puis stocké dans un contenant isotherme à l'abri de la lumière et à température ambiante jusqu'à leur analyse.

Les fleurs d'eau peuvent s'accumuler à des distances plus ou moins importantes des zones de production benthique d'*Ostreopsis*, en fonction de l'orientation et de l'intensité des courants et des vents. Elles seront donc à rechercher préférentiellement dans les zones où des déchets ou des organismes marins planctoniques (comme les méduses) sont souvent retrouvés en quantités importantes sous l'effet de ces mêmes vents et courants. Actuellement, aucune méthode n'a été développée pour estimer la surface impactée, le nombre et la taille des agrégats. Ainsi, en cas de présence de fleurs d'eau, même éloignées d'un site de baignade ou d'activités de loisirs nautiques ou de zones conchylicoles, le GT « *Ostreopsis* » recommande de réaliser un prélèvement de ces agrégats avec de l'eau environnante à l'aide d'un sac plastique ou d'un flacon en plastique à large ouverture afin de faciliter la récolte. Le prélèvement devra être fixé au lugol acide (1% volume/volume) puis stocké dans un contenant isotherme à l'abri de la lumière et à température ambiante en attendant son analyse.

Prélèvement et conservation des cellules d'*Ostreopsis* benthiques

Comme pour le compartiment planctonique, il n'existe pas de méthode normalisée pour prélever les cellules d'*Ostreopsis* sur des substrats benthiques ni d'approche permettant d'estimer l'étendue de la zone couverte par les biofilms d'*Ostreopsis* sur les divers substrats des sites suivis. Cependant, la méthode de dénombrement des cellules d'*Ostreopsis* benthiques la plus couramment utilisée consiste à dénombrer les dinoflagellés présents sur des macrophytes et de les rapporter à une unité de poids frais de macrophytes échantillonnés.

Comme pour l'échantillonnage des cellules dans le compartiment planctonique, le GT « *Ostreopsis* » recommande de réaliser trois prélèvements de cellules d'*Ostreopsis* sur des substrats situés à 50 cm de profondeur et régulièrement répartis dans la zone faisant l'objet du contrôle sanitaire. Les macrophytes seront échantillonnés avec l'eau de mer environnante dans un flacon en plastique de 250 mL sachant qu'il est préconisé de récolter entre 5 et 10 g (masse humide) de macrophytes par échantillon. Les échantillons (eau + macrophyte) seront fixés sur place au lugol acide (1% volume/volume) et stockés à l'abri de la lumière et à température ambiante dans un contenant isotherme. Le dénombrement des cellules d'*Ostreopsis* sera réalisé sur chacun des trois échantillons et c'est la valeur d'abondance la plus élevée qui sera retenue pour le contrôle sanitaire.

Le GT « *Ostreopsis* » recommande que les résultats d'identification et de dénombrement des cellules d'*Ostreopsis* dans les échantillons prélevés soient rendus dans un délai maximum de 48h pour favoriser une gestion précoce des proliférations.

Identification et comptage des cellules d'*Ostreopsis*

Le GT « *Ostreopsis* » préconise que les comptages de cellules d'*Ostreopsis* dans les échantillons prélevés dans les compartiments benthique et planctonique soient effectués par la méthode Utermöhl à l'aide d'un microscope inversé, ou en utilisant des lames calibrées de 1 mL (ex : Sedgewick Rafter) lorsque cette méthode n'est plus adaptée en raison de fortes abondances cellulaires. Les lames calibrées de 1 mL s'observent généralement avec un microscope droit, mais l'utilisation d'un microscope inversé est possible. Pour les deux méthodes, un minimum de 200 à 400 cellules d'*Ostreopsis* devra être compté pour avoir un intervalle de confiance des comptages de 14% et 10%, respectivement.

La reconnaissance du genre *Ostreopsis* se fait en microscopie optique, grâce à la forme des cellules (lentille). En revanche, il n'est pas possible de différencier les espèces *O. cf. ovata* et *O. cf. siamensis* par cette méthode.

Devant l'absence de méthode fiable et rapide permettant de distinguer *O. cf. ovata* et *O. cf. siamensis*, le GT « *Ostreopsis* » recommande de limiter l'identification au niveau du genre des cellules d'*Ostreopsis* dans les différents compartiments (benthique, planctonique, fleurs d'eau).

L'identification des cellules d'*Ostreopsis* à l'échelle du genre et leur dénombrement sont des étapes délicates qui nécessitent du personnel qualifié. Le GT « *Ostreopsis* » recommande donc que les opérateurs de laboratoire soient formés afin de pouvoir identifier et dénombrer facilement les cellules d'*Ostreopsis*.

3.2.2. Surveillance des *Ostreopsis* dans les aérosols

En l'absence de connaissances suffisantes relatives à la nature des composés toxiques et des processus à l'origine de leur transfert vers l'atmosphère, les experts du GT « *Ostreopsis* » ne recommandent pas, pour l'instant, la mise en place d'un contrôle sanitaire des aérosols.

3.2.3. Surveillance des produits de la mer

Face au risque de colonisation de nouveaux sites par *Ostreopsis* sur le littoral de Nouvelle-Aquitaine, le GT « *Ostreopsis* » recommande de sélectionner dès à présent, sur la côte atlantique, un ou plusieurs sites de production conchylicole et de pêche à pied susceptibles d'être contaminés, pour être intégrés dans le réseau EMERGTOX (réseau de veille d'émergence des biotoxines marines dans les coquillages).

Par ailleurs, le GT « *Ostreopsis* » recommande de mettre en place au niveau national un cahier de prescriptions décrivant la stratégie de prélèvement de coquillages dans les zones conchylicoles touchées par une prolifération d'*Ostreopsis*, ainsi que l'approche analytique à utiliser pour l'identification et la quantification des toxines impliquées. Cela constituera un outil d'aide à la décision pour les gestionnaires, comme c'est le cas pour les toxines faisant déjà l'objet d'une recommandation (cahier de prescription REPHYTOX).

En plus du suivi des mollusques bivalves, il conviendra d'évaluer la contamination d'autres produits de la mer collectés dans une zone impactée par une prolifération d'*Ostreopsis* (céphalopodes, crustacés, gastéropodes, oursins, poissons, algues destinées à la consommation humaine). Il conviendrait d'étudier la possibilité d'utiliser les oursins (gonades et chair restante) comme organisme sentinelle pour la détection de la contamination des produits de la mer par des toxines du groupe de la PLTX.

3.2.4. Proposition de valeur guide en toxines produites par *Ostreopsis*

Compte tenu de l'absence de connaissance sur le ou les composés à l'origine des intoxications humaines signalées lors des épisodes de prolifération d'*Ostreopsis* sur la côte basque, le GT « *Ostreopsis* » ne propose pas de valeur guide pour les toxines produites par *Ostreopsis* dans l'eau ou dans les aérosols.

Pour les coquillages, à partir de la VTR aiguë par voie orale de 0,08 µg PLTX.kg⁻¹ pc (Anses 2023), d'une taille de portion par défaut de 400 g de chair de mollusques bivalves (EFSA 2010) et d'un poids corporel par défaut de 70 kg, le GT « *Ostreopsis* » et le CES ERCA recommandent **une valeur guide de 15 µg eq. PLTX.kg⁻¹ de chair de coquillages** (corps entier ou dans toute partie comestible séparément), **pour la somme PLTX + OVTX + OST-D** (somme massique non pondérée).

En cas de dépassement de cette valeur guide dans les coquillages, le GT « *Ostreopsis* » recommande :

- de ne pas consommer de coquillages issus de la zone impactée par la prolifération (récolte professionnelle et de loisir) ;
- d'acquérir des données complémentaires de contamination dans les coquillages dans la zone impactée par la prolifération (pour l'espèce pour laquelle le dépassement a été observé et pour d'autres espèces exploitées et/ou consommées sur la zone).

Pour les produits de la mer autres que les coquillages collectés dans une zone impactée par une prolifération d'*Ostreopsis* (céphalopodes, crustacés, oursins, poissons, algues destinées à la consommation humaine) et en l'état actuel des connaissances, le GT « *Ostreopsis* » et le CES « ERCA » ne recommandent pas de valeur guide pour les toxines du groupe de la PLTX. Le GT « *Ostreopsis* » attire l'attention sur le besoin d'acquérir des données de contamination en France pour juger de l'opportunité de proposer une valeur guide à l'avenir. Par ailleurs, lors des épisodes de proliférations d'*Ostreopsis*, **le GT « *Ostreopsis* » recommande que les poissons pêchés dans la zone impactée par la prolifération soient systématiquement éviscérés avant consommation et avant congélation. Les petits poissons ne doivent pas être consommés entiers.**

Pour les oursins, les toxines du groupe de la PLTX se retrouvent également préférentiellement dans les viscères, qui ne sont normalement pas consommés. Le GT « *Ostreopsis* » recommande d'informer les consommateurs d'oursins de ne pas consommer les viscères et de respecter l'interdiction de pêche estivale lorsqu'elle existe.

Enfin, dans les zones impactées par une prolifération d'*Ostreopsis*, le GT « *Ostreopsis* » recommande de ne pas récolter les macroalgues pendant toute la durée de l'épisode.

3.3. Recommandations pour la détection et la quantification des toxines

Il existe dans la littérature de nombreux protocoles pour l'extraction et l'analyse des toxines du groupe de la PLTX, mais aucun n'est standardisé, que ce soit dans les cellules de microalgues, l'eau de mer, les aérosols ou les organismes marins. Les approches analytiques mises en œuvre sont de nature chimique ou biologique. Les méthodes les plus adaptées à l'analyse des toxines produites par *Ostreopsis*, en fonction de leurs performances et de leur spécificité, sont

la LC-MS/MS⁵ ainsi que les tests biologiques : tests immunologiques (ELISA) ou cellulaires (Neuro-2a et hémolytique). Si la LC-MS/MS ciblée permet de déterminer le profil toxinique de l'extrait analysé, elle pourrait être utilisée conjointement avec l'un des trois tests biologiques, dans la mesure où ils permettent d'appréhender la diversité des toxines présentes, même en l'absence d'étalons. Les résultats sont alors exprimés en eq. PLTX.

Pour les toxines qui ne sont pas du groupe de la PLTX, le GT « *Ostreopsis* » n'a pas identifié de méthode analytique pouvant être mise en œuvre à l'heure actuelle.

Pour les coquillages, le GT « *Ostreopsis* » recommande de poursuivre l'optimisation des méthodes d'analyse chimiques ciblées comme la LC-MS/MS couplée à la détection par spectrométrie d'absorption moléculaire (dans l'ultraviolet, UV) en intégrant, en plus de la PLTX, l'ensemble des toxines du groupe de la PLTX et en se basant, à défaut d'étalon, sur leurs masses moléculaires et leurs maxima d'absorption UV. **La méthode développée devra être suffisamment sensible afin d'être en cohérence avec la valeur guide proposée pour les coquillages (15 µg eq PLTX.kg⁻¹).**

Le GT « *Ostreopsis* » recommande également de développer un test biologique pour la recherche de toxines du groupe de la PLTX non pris en compte par l'analyse ciblée par LC-MS/MS. Dès que des étalons des toxines du groupe de la PLTX seront disponibles, le couple d'approches devra être validé, avant de considérer son entrée dans un processus de normalisation.

En cas de non concordance des résultats de ce couple d'approches (sous-estimation par l'analyse chimique ciblée), le GT « *Ostreopsis* » recommande d'avoir recours ultérieurement à une analyse non ciblée en utilisant la spectrométrie de masse haute résolution (LC-HRMS) afin d'acquérir des éléments physico-chimiques sur d'éventuels nouveaux métabolites non détectés par analyse ciblée mais pris en compte par le test biologique (formule brute, données spectrales, etc.).

3.4. Recommandations pour limiter l'exposition des professionnels et des riverains sur la côte basque

Les professionnels représentent une population particulièrement touchée par la présence des proliférations d'*Ostreopsis*, qu'il s'agisse des maîtres-nageurs sauveteurs, du personnel encadrant les activités de loisir, des personnes en charge des prélèvements (ci-après nommés préleveurs), ou des commerçants ayant une activité en bordure de plage. L'analyse des cas d'intoxication des professionnels au cours des étés 2021 et 2022 sur la côte basque suggère une aggravation et une durée prolongée des signes et symptômes d'une année à l'autre. En Espagne et en France, des cas d'intoxications ont également été signalés chez des riverains exposés aux aérosols lors des épisodes de proliférations d'*Ostreopsis* (Berdalet *et al.*, 2022).

Le GT « *Ostreopsis* » souligne l'importance de diffuser auprès des professionnels, dès la saison balnéaire 2023, des messages d'information relatifs aux risques liés aux proliférations d'*Ostreopsis* et de préconiser des mesures préventives spécifiques adaptées (ex : lavage fréquents des mains après les prélèvements, prise de douche, nettoyage et recouvrements des plaies, etc.). En outre, le GT recommande un suivi médical spécifique des riverains et des professionnels travaillant sur, ou à proximité immédiate, des sites touchés par les proliférations d'*Ostreopsis*, qu'il s'agisse de personnels permanents ou saisonniers, pour des expositions aiguës ou répétées. Pour

⁵ Chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse en tandem

les travailleurs indépendants, il est possible de demander une consultation médicale auprès de leur caisse d'assurance maladie. En complément, un bilan saisonnier des cas d'intoxication chez les riverains des sites touchés par les proliférations d'*Ostreopsis* permettrait de recueillir des informations sur leur exposition.

Par ailleurs, afin de construire un plan d'action et de prévention pour les professionnels à l'égard de l'exposition aux *Ostreopsis*, le GT « *Ostreopsis* » recommande également de procéder à une évaluation des risques pour chaque poste potentiellement exposé (obligation définie par l'article L4121-2 du code du travail). Pour le risque spécifiquement lié à l'inhalation d'aérosols, l'exposition journalière des professionnels stationnant sur ou à proximité de la plage contaminée pourrait être suivie grâce aux méthodes d'échantillonnage utilisées pour collecter les aérosols contenant des brevétotoxines (Anses, 2021). Ces données permettraient à terme de définir des seuils de toxicité des aérosols produits lors de proliférations d'*Ostreopsis*.

Enfin, devant la possibilité d'extension des proliférations d'*Ostreopsis* vers les zones conchylicoles des côtes de la Nouvelle-Aquitaine, le GT « *Ostreopsis* » préconise que d'ores et déjà des messages d'information sur les risques liés aux proliférations d'*Ostreopsis* soient communiqués aux personnels du secteur de production conchylicole (pêcheurs, travailleurs des sites de production conchylicole ou de pêche) ainsi qu'aux algoculteurs.

Dans l'attente des résultats des études préconisées *supra*, et afin de limiter l'exposition des professionnels, le GT « *Ostreopsis* » rappelle que l'article L. 230-2 du code du travail précise que « *l'employeur prend les mesures nécessaires pour assurer la sécurité et protéger la santé des travailleurs de l'établissement, y compris les travailleurs temporaires* ». Pour cela, le GT « *Ostreopsis* » propose que des mesures préventives spécifiques adaptées soient mises en place et que des équipements de protection individuelle spécifiques soient mis à disposition des travailleurs, en fonction des tâches à réaliser ; en particulier, pour les préleveurs, le port de gants, de chaussures adaptées et d'une combinaison de plongée est préconisé. Le GT « *Ostreopsis* » recommande que les équipements de protection fassent l'objet d'un rinçage à l'eau douce après la session de prélèvements. Le GT « *Ostreopsis* » recommande également que les préleveurs prennent une douche savonnée à l'eau douce après avoir effectué les prélèvements.

En outre, le GT « *Ostreopsis* » **préconise une adaptation de la durée de travail pour les postes les plus exposés aux aérosols, dès lors qu'une prolifération d'*Ostreopsis* est signalée, afin de limiter la durée d'exposition.**

Par ailleurs, dans les zones concernées par les proliférations d'*Ostreopsis*, le GT « *Ostreopsis* » recommande que les médecins du travail soient sensibilisés aux risques liés à l'exposition aiguë ou répétée à *Ostreopsis*.

3.5. Outil d'aide à la décision pour la gestion des proliférations d'*Ostreopsis* sur la côte basque

Pour aider les collectivités concernées par les proliférations d'*Ostreopsis*, le GT « *Ostreopsis* » propose une stratégie de surveillance et de contrôle sanitaire (figure 1) basée sur une collaboration entre le gestionnaire du site et les agences régionales de santé (ARS),

applicable sur les sites actuellement encadrés par le contrôle sanitaire des eaux de baignade ainsi que sur les sites de pratique de loisirs nautiques qui répondent aux conditions ci-après.

En premier lieu, le GT « *Ostreopsis* » recommande la mise en place d'un contrôle sanitaire des sites connus pour héberger des proliférations d'*Ostreopsis*. Ce contrôle sera réalisé *a minima* pendant la période estivale (15 mai au 15 septembre) et sera basé sur le prélèvement d'eau, de macrophytes et de fleurs d'eau si elles sont présentes.

En parallèle du contrôle sanitaire et même hors période estivale, le signalement de cas d'intoxication à *Ostreopsis* par une structure médicale devra déclencher un prélèvement d'eau, de macrophytes et de fleurs d'eau si elles sont présentes, pour analyse.

Le GT « *Ostreopsis* » préconise un suivi visuel quotidien du site dès la fin du printemps, visant à repérer, en temps réel, la présence de fleurs d'eau ou des changements dans la couleur de l'eau. La perception d'un goût métallique dans la bouche lors de ce suivi sera également un indicateur potentiel de la présence d'une prolifération d'*Ostreopsis*. Ces phénomènes déclencheront un prélèvement d'eau et de macrophytes pour analyse. Ce suivi sensoriel pourra être réalisé par des professionnels travaillant sur le littoral ou dans le cadre de programmes organisés de surveillance participative.

La présence d'*Ostreopsis* dans au moins un des compartiments (benthique ou planctonique) devra conduire au dénombrement des cellules. Les résultats de comptage des cellules d'*Ostreopsis* définissent trois niveaux d'alerte différents. Les seuils d'abondances cellulaires choisis pour définir ces niveaux d'alerte (pour le compartiment planctonique) sont les mêmes que ceux appliqués actuellement sur la côte méditerranéenne, que ce soit en France, en Italie ou en Espagne.

L'Alerte 1 est déclenchée lorsque les abondances des cellules d'*Ostreopsis* sont inférieures à 30 000 cell.L⁻¹ dans l'eau et à 200 000 cell.g⁻¹ PF sur les macrophytes et/ou quand un cas d'intoxication humaine est signalé. Ce niveau d'alerte permet de maintenir à la normale les activités. Le renouvellement des prélèvements est réalisé de façon bimensuelle dans le cadre du contrôle sanitaire des eaux de baignade. Cependant, si des seuils de 10 000 cell.L⁻¹ d'eau ou 20 000 cell.g⁻¹ PF par macrophyte sont dépassés (tout en étant inférieurs à 30 000 cell.L⁻¹ et 200 000 cell.g⁻¹, respectivement), il est conseillé d'informer le gestionnaire du site d'un risque de proliférations et de renouveler les prélèvements à une fréquence hebdomadaire pour de nouveaux comptages.

L'Alerte 2 est déclenchée lorsque les abondances de cellules d'*Ostreopsis* sont comprises entre 30 000 et 100 000 cell.L⁻¹ dans l'eau ou entre 200 000 et 500 000 cell.g⁻¹ PF sur les macrophytes et/ou lorsque le nombre de cas d'intoxication humaine signalés sur un même site sur une période de 48h est compris entre deux et neuf. Ce niveau d'alerte conduit à la mise en place des mesures de gestion suivantes :

- la population est informée du danger avec un accent particulier pour les populations à risque (personnes ayant des antécédents de problèmes respiratoires) ;
- la pratique de la baignade et /ou des activités de loisirs sur ou à proximité du site contaminé est déconseillée pour les populations à risque ;
- le poste de travail des professionnels travaillant sur ou à proximité de la plage doit être adapté en fonction des préconisations de la médecine du travail.

À ce niveau d'alerte, des prélèvements d'eau et de macrophytes doivent être réalisés de façon bihebdomadaire afin de suivre la dynamique des proliférations.

L'Alerte 3 est déclenchée lorsque les abondances de cellules d'*Ostreopsis* sont supérieures à 100 000 cell.L⁻¹ dans l'eau ou à 500 000 cell.g⁻¹ PF sur les macrophytes, et/ou lorsque 10 cas d'intoxication humaine ou plus sont signalés sur un même site sur une période de 48h. En plus des recommandations faites dans le niveau d'alerte 2 en termes d'information et de protection du public et des professionnels, le niveau d'alerte 3 conduit à la fermeture de la plage et à l'interdiction de la pratique des activités de loisirs sur ou à proximité de la plage où les proliférations d'*Ostreopsis* ont été observées.

À ce niveau d'alerte, un prélèvement journalier d'eau et de macrophytes permettra de suivre l'évolution des proliférations, de rouvrir la plage et de reprendre la pratique des activités nautiques dès que les abondances cellulaires d'*Ostreopsis* seront inférieures aux seuils fixés pour l'alerte 2.

Les messages de prévention à mettre en place dès l'alerte 2, devront préciser qu'une douche doit être prise avec de l'eau douce après la baignade ou toute autre activité nautique et qu'une consultation médicale est recommandée en cas d'apparition de signes cliniques suspects consécutifs à une exposition avec de l'eau de mer ou des aérosols. Ces messages devront inviter les populations à risque (personnes ayant des antécédents de problèmes respiratoires) à prendre conseil auprès d'un professionnel de santé et à limiter l'exposition potentielle aux *Ostreopsis* en ne fréquentant pas les zones impactées.

Par ailleurs, le GT « *Ostreopsis* » recommande pour le littoral de la Nouvelle-Aquitaine de reconduire la procédure de signalement des cas établie, pour la saison 2022, par le centre antipoison et de toxicovigilance (CAP-TV) de Bordeaux et l'ARS de Nouvelle-Aquitaine. Les postes de secours pourraient être également associés à la procédure de recueil des signalements d'intoxication selon des modalités à définir avec le CAP-TV de Bordeaux.

Le GT « *Ostreopsis* » rappelle que les seuils d'abondance cellulaire choisis pour définir les niveaux d'alerte sont les mêmes que ceux appliqués actuellement sur la côte méditerranéenne pour le compartiment planctonique, que ce soit en France, en Italie ou en Espagne. Les seuils d'alerte pour l'abondance des cellules d'*Ostreopsis* dans le compartiment benthique ont été définis à partir de retours d'expérience de suivis réalisés sur la côte méditerranéenne. Ils pourront être réévalués pour la côte basque à l'issue des prochaines saisons estivales.

Par ailleurs, le GT « *Ostreopsis* » recommande de recueillir dès la saison estivale 2023, des données météorologiques et océanographiques (température, force du vent, hydrodynamisme, etc.) qui permettront d'optimiser la stratégie de surveillance les saisons suivantes.

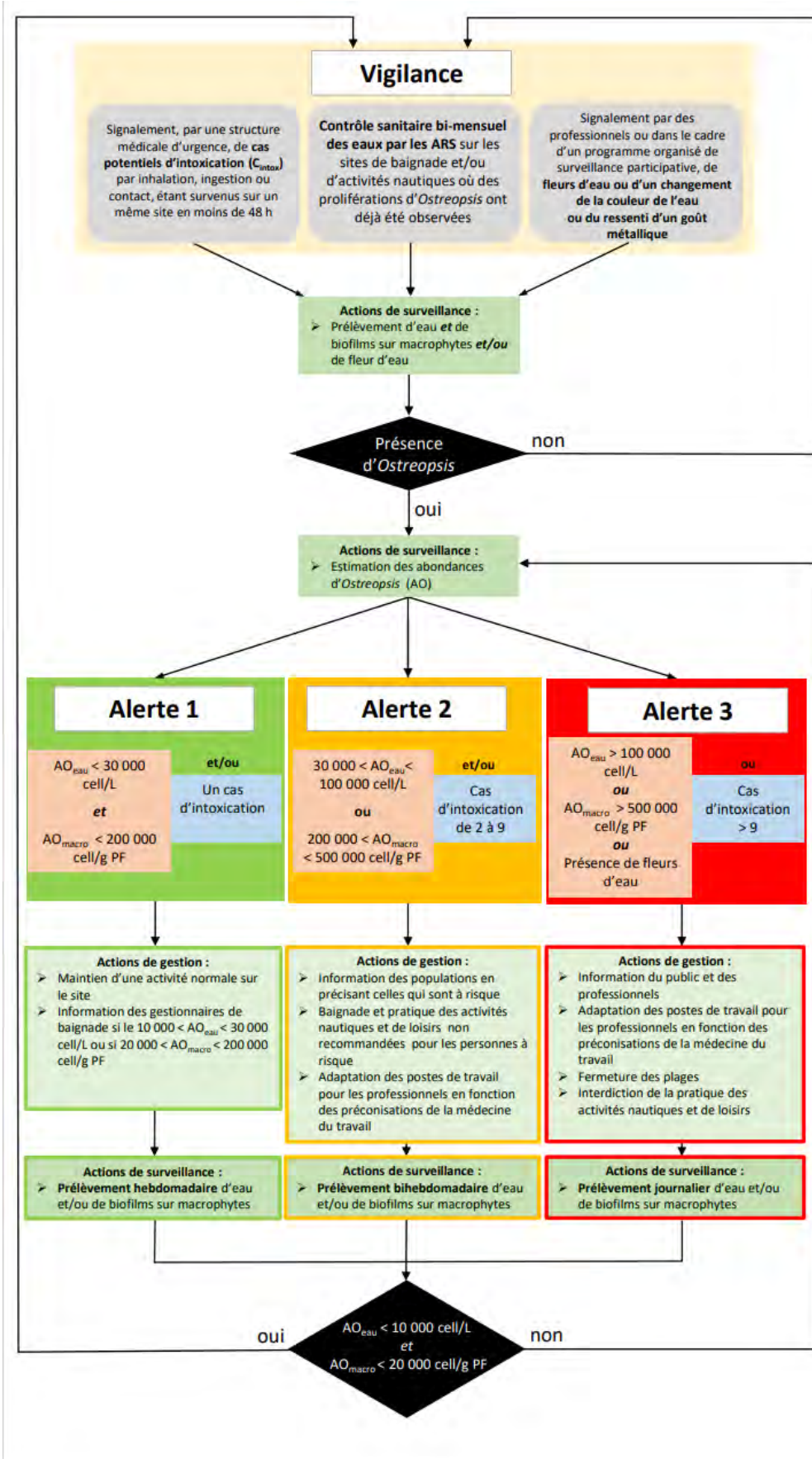


Figure 1 : Arbre décisionnel pour la surveillance et le contrôle sanitaire des sites de baignade et des sites d'activités de loisirs nautiques touchés par des proliférations d'*Ostreopsis*

3.6. Besoins de recherche

Les connaissances sur le genre *Ostreopsis* dans les zones tempérées restent à ce jour encore très parcellaires en raison de l'expansion récente de son aire de distribution dans ces zones. Les besoins de recherche sont donc très importants aussi bien sur la diversité, la biologie, la physiologie et l'écologie de ce genre, que sur la diversité des toxines, leurs structures et leur toxicité par différentes voies d'exposition. Les impacts sanitaires sur les populations nécessitent également de nombreuses recherches sur les effets à court, moyen et long terme de ces molécules et selon les différentes voies d'exposition. Le détail des besoins de recherche exprimés par le GT « *Ostreopsis* » est développé en annexe 3.

4. CONCLUSIONS DE L'AGENCE

En France, la présence de microalgues marines du genre *Ostreopsis* est identifiée de façon récurrente sur les côtes méditerranéennes depuis plusieurs années. À la faveur de l'évolution des conditions climatiques, les zones dans lesquelles *Ostreopsis* est observée s'étendent. Ainsi, durant les étés 2021 et 2022, des épisodes importants de prolifération d'*Ostreopsis* ont également été signalés sur la côte basque. Ces microalgues peuvent causer des intoxications humaines lorsque les personnes sont exposées aux cellules ou aux toxines qu'elles produisent. Le bilan épidémiologique réalisé en 2021 et 2022 sur 777 personnes intoxiquées lors des épisodes basques par le centre antipoison de Bordeaux montre que la voie principale d'exposition à *Ostreopsis* est l'inhalation d'aérosols marins contaminés, même si d'autres voies sont possibles (contact cutané, oculaire, ingestion d'eau). Concernant la voie alimentaire, de rares cas d'intoxication humaine ont été rapportés dans la littérature en lien avec la consommation de produits de la mer contaminés par des toxines du groupe de la palytoxine, mais le lien reste suspecté et non avéré à ce jour.

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions des experts.

L'examen de la littérature, réalisé dans le cadre de cette expertise, a mis en évidence des connaissances encore trop parcellaires sur le genre *Ostreopsis* (diversité, biologie, écologie toxines produites) pour en caractériser le danger et le risque pour la santé humaine. Il n'est en effet pas possible, à ce jour, de déterminer si les effets sanitaires signalés sont attribuables à des cellules d'*Ostreopsis*, à des débris cellulaires, aux toxines produites ou d'autres composés. L'Agence souligne donc la nécessité de poursuivre les travaux de recherche sur les cellules d'*Ostreopsis* et en particulier de déterminer les composés à caractère toxique responsables des symptômes observés chez l'Homme dans l'eau, les aérosols et les produits de la mer. Par ailleurs, l'Agence encourage les études qui permettront d'apporter des connaissances sur le mécanisme de migration verticale des cellules d'*Ostreopsis* qui survient au cours de la journée entre les substrats benthiques et la colonne d'eau. Pour cela, les scientifiques pourront exploiter la base de données océano-climatiques construite par l'Ifremer et le groupement d'intérêt scientifique (GIS) littoral basque.

Dans l'attente des résultats de ces travaux, et afin d'appuyer les autorités sanitaires et les collectivités concernées par les proliférations d'*Ostreopsis*, une stratégie graduée de surveillance, de contrôle et de gestion des sites de baignade et d'activités de loisirs nautiques est proposée. Cette stratégie, basée sur une collaboration entre le gestionnaire du site et les agences régionales de santé (ARS), est synthétisée sous la forme d'un arbre décisionnel présenté dans cet avis (cf. figure 1, page 20). En appui au déploiement de cette stratégie, l'Agence souligne également les recommandations des experts relatives au développement et à la standardisation des méthodes analytiques de détection et de suivi.

S'articulant autour de trois niveaux d'alerte pour graduer les mesures de surveillance et de gestion des sites touchés par des proliférations d'*Ostreopsis*, cette stratégie de surveillance se base sur les connaissances scientifiques et de gestion acquises sur le pourtour méditerranéen depuis une quinzaine d'années. Cependant, la topographie, l'hydrodynamisme et les conditions météorologiques des côtes de la Nouvelle-Aquitaine étant différentes de celles des côtes méditerranéennes, l'Agence souligne que les mesures de gestion proposées devront être réévaluées en fonction des résultats des données de surveillance qui seront recueillies lors des deux prochaines saisons balnéaires et ajustées en tant que de besoin.

Par ailleurs, l'analyse des cas d'intoxications signalés sur la côte basque montre que les professionnels constituent une population particulièrement touchée par les proliférations d'*Ostreopsis* ; la gravité des symptômes développés n'est pas différente de ceux développés par la population générale mais ces symptômes semblent plus nombreux et de durée plus longue même en dehors de la période de prolifération. L'Agence insiste sur l'importance de diffuser, auprès des professionnels concernés, des messages de prévention des risques liés aux proliférations d'*Ostreopsis*, d'adapter la durée de travail, et de mettre en place un suivi médical spécifique de ces populations à définir conjointement par la médecine du travail, avec l'appui des centres antipoison et de toxicovigilance en lien avec les employeurs.

Enfin, l'Agence estime que devant l'émergence de ces phénomènes de proliférations d'*Ostreopsis* sur la côte basque et dans une optique d'adapter les mesures de prévention, il serait pertinent de documenter le niveau de perception des dangers associés aux proliférations d'*Ostreopsis* par les différentes catégories d'usagers de la mer et des plages ainsi que la compréhension (et/ou acceptabilité) des mesures prises pour protéger les populations de ces dangers.

Pr Benoit Vallet

MOTS-CLÉS

Ostreopsis, dinoflagellés, toxines émergentes, biotoxines marines, coquillages, eaux de baignade, eau de mer

Ostreopsis, *dinoflagellates*, *emerging toxins*, *marine biotoxins*, *shellfish*, *recreational water*, *seawater*

CITATION SUGGÉRÉE

Anses (2023). Avis relatif aux risques pour la santé humaine liés aux proliférations d'*Ostreopsis* spp. sur le littoral basque (saisine 2021-SA-0212). Maisons-Alfort : Anses, 42 p.

BIBLIOGRAPHIE

- Abe, T., T. Naito et D. Uemura. 2017. "Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis of palytoxin." *Natural Product Communications* 12 (8): 1205-1207. <https://doi.org/10.1177/1934578x1701200815>.
- Accoroni, S., T. Romagnoli, F. Colombo, C. Pennesi, C. G. di Camillo, M. Marini, C. Battocchi, P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso, L. Tartaglione, A. Penna et C. Totti. 2011. "*Ostreopsis* cf. *ovata* bloom in the northern Adriatic Sea during summer 2009: Ecology, molecular characterization and toxin profile." *Marine Pollution Bulletin* 62 (11): 2512-2519. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.08.003>.
- Accoroni, S., T. Romagnoli, A. Penna, S. Capellacci, P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, L. Tartaglione, M. Abboud-Abi Saab, V. Giussani, V. Asnaghi, M. Chiantore et C. Totti. 2016. "*Ostreopsis fattorussoi* sp. nov. (Dinophyceae), a new benthic toxic *Ostreopsis* species from the eastern Mediterranean Sea." *Journal of Phycology* 52 (6): 1064-1084. <https://doi.org/10.1111/jpy.12464>.
- Accoroni, S. et C. Totti. 2016. "The toxic benthic dinoflagellates of the genus *Ostreopsis* in temperate areas: A review." *Advances in Oceanography and Limnology* 7 (1): 1-15. <https://doi.org/10.4081/aiol.2016.5591>.
- Afssa. 2007. Appui scientifique et technique de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la consommation de produits de la mer en présence d'*Ostreopsis ovata*.
- Afssa. 2008. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la pertinence de compléter le dispositif général de surveillance du milieu marin et des aliments mis sur le marché par la prise en compte de la microalgue épibenthique *Ostreopsis*.
- Aligizaki, K., P. Katikou, G. Nikolaidis et A. Panou. 2008. "First episode of shellfish contamination by palytoxin-like compounds from *Ostreopsis* species (Aegean Sea, Greece)." *Toxicon* 51 (3): 418-427. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.10.016>.
- Aligizaki, K. et G. Nikolaidis. 2006. "The presence of the potentially toxic genera *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) in the North Aegean Sea, Greece." *Harmful Algae* 5 (6): 717-730. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2006.02.005>.
- Alkhatib Houda, Bennouna Asmae, Abouabdellah Rachid, Amzil Zouher, Herve Fabienne, Moussavou-Mouity Cyrielle Amour, Elayoubi Salaheddine, Bekkali Mohammed, Fahde Abdelilah 2022. *Ostreopsis* spp.: Morphology, proliferation and toxic profile in the North-West of Agadir (North Atlantic Ocean). *Regional Studies In Marine Science*, 56, 102713 (11p.) . <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2022.102713>.
- Amorim, A., V. Veloso et A. Penna. 2010. "First detection of *Ostreopsis* cf. *siamensis* in Portuguese coastal waters." *Harmful Algae News* 42: 6-7.
- Amzil, Z., N. Chomérat, F. Hervé, G. Bilien, L. Carpentier et V. Séchet. 2021. Prolifération d'*Ostreopsis* spp. dans les Pays Basques durant l'été 2021 : Profils toxique et taxonomie. Rapport d'expertise IFREMER, 7 pages, septembre 2021.

- Amzil, Z., M. Sibat, N. Chomerat, H. Grosseil, F. Marco-Miralles, R. Lemee, E. Nezan et V. Sechet. 2012. "Ovatoxin-a and Palytoxin Accumulation in Seafood in Relation to *Ostreopsis cf. ovata* Blooms on the French Mediterranean Coast." *Marine Drugs* 10 (2): 477-496. <https://doi.org/10.3390/md10020477>.
- Anses. 2021 AVIS révisé, AVIS et RAPPORT de l'Anses sur l'état des connaissances relatives à l'exposition aux brévétoxines par consommation de coquillages, par inhalation d'embruns ou par contact direct avec de l'eau contaminée en cas de baignade.
- Anses. 2023. Avis relatif à l'élaboration de VTR pour la palytoxine (CAS n° 77734-91-9) (en cours de finalisation).
- Battocchi, C., C. Totti, M. Vila, M. Masó, S. Capellacci, S. Accoroni, A. Reñé, M. Scardi et A. Penna. 2010. "Monitoring toxic microalgae *Ostreopsis* (dinoflagellate) species in coastal waters of the Mediterranean Sea using molecular PCR-based assay combined with light microscopy." *Marine Pollution Bulletin* 60 (7): 1074-1084. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.01.017>.
- Boente-Juncal, A., C. Vale, M. Camiña, J. M. Cifuentes, M. R. Vieytes et L. M. Botana. 2020. "Reevaluation of the acute toxicity of palytoxin in mice: Determination of lethal dose 50 (LD50) and No-observed-adverse-effect level (NOAEL)." *Toxicon* 177: 16-24. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.01.010>.
- Boente-Juncal, Andrea, Sandra Raposo-García, Carmen Vale, M. Carmen Louzao, Paz Otero et Luis M. Botana. 2020. "In Vivo Evaluation of the Chronic Oral Toxicity of the Marine Toxin Palytoxin." *Toxins* 12 (8): 489. <https://doi.org/10.3390/toxins12080489>.
- Calon, T., S. Sinno-Tellier, L. de Haro et J. Bloch. 2019. "Palytoxin exposure induced by soft corals in aquariums: Cases report of French poison centers network from 2000 to 2017." *Toxicologie Analytique et Clinique* 31 (1): 64-76. <https://doi.org/10.1016/j.toxac.2018.11.003>.
- Chomérat N., Antajan E., Aubry I., Bilien G., Carpentier L., Casamajor M.N., Ganthy F., Hervé F., Labadie M., Méteigner C., Paradis C., Perrière-Rumèbe M., Sanchez F., Séchet V., Amzil Z., 2022. First Characterization of *Ostreopsis cf. ovata* (Dinophyceae) and Detection of Ovatoxins during a Multispecific and Toxic *Ostreopsis* Bloom on French Atlantic Coast. *Mar Drugs*. Jul 18;20(7):461. doi: 10.3390/md20070461. PMID: 35877754; PMCID: PMC9315632.
- Ciminiello, P., C. Dell'Aversano, E. Fattorusso et M. Forino. 2010. "Palytoxins: A still haunting Hawaiian curse." *Phytochemistry Reviews* 9 (4): 491-500. <https://doi.org/10.1007/s1101-010-9185-x>
- Ciminiello, P., C. Dell'Aversano, E. D. Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino, L. Tartaglione, T. Yasumoto, C. Battocchi, M. Giacobbe, A. Amorim et A. Penna. 2013. "Investigation of toxin profile of Mediterranean and Atlantic strains of *Ostreopsis cf. siamensis* (Dinophyceae) by liquid chromatography–high resolution mass spectrometry." *Harmful Algae* 23: 19-27. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.hal.2012.12.002>.
- Ciminiello, P., C. Dell'Aversano, E. Fattorusso, M. Forino, G.S. Magno, L. Tartaglione, C. Grillo et N. Melchiorre. 2006. "The Genoa 2005 outbreak. Determination of putative palytoxin in mediterranean *Ostreopsis ovata* by a new liquid chromatography tandem mass spectrometry method." *Analytical Chemistry* 78 (17): 6153-6159. <https://doi.org/10.1021/ac060250j>.
- Del Favero, G., D. Beltramo, M. Sciancalepore, P. Lorenzon, T. Coslovich, M. Poli, E. Testai, S. Sosa et A. Tubaro. 2013. "Toxicity of palytoxin after repeated oral exposure in mice and *in vitro* effects on cardiomyocytes." *Toxicon* 75: 3-15. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.06.003>.
- Del Favero, G., S. Sosa, M. Pelin, E. D'Orlando, C. Florio, P. Lorenzon, M. Poli et A. Tubaro. 2012. "Sanitary problems related to the presence of *Ostreopsis* spp. in the Mediterranean Sea: A multidisciplinary scientific approach." *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita* 48 (4): 407-414. https://doi.org/10.4415/ANN_12_04_08
- dos Santos, M.C., B.C. de Albuquerque, R.C. Pinto, G.P. Aguiar, A G. Lescano, J.H. Santos et M.D. Alecrim. 2009. "Outbreak of Haff disease in the Brazilian Amazon." *Rev Panam Salud Publica* 26 (5): 469-70. <https://doi.org/10.1590/s1020-49892009001100012>.
- Drouet, K., C. Jauzein, D. Herviot-Heath, S. Hariri, A. Laza-Martinez, C. Lecadet, M. Plus, S. Seoane, M. Sourisseau, R. Lemée et R. Siano. 2021. "Current distribution and potential expansion of the harmful benthic dinoflagellate *Ostreopsis cf. siamensis* towards the warming waters of the Bay

- of Biscay, North-East Atlantic." *Environmental Microbiology* 23 (9): 4956-4979. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15406>.
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM); Statement on further elaboration of the consumption figure of 400 g shellfish meat on the basis of new consumption data. *EFSA Journal* 2010; 8(8):1706. [20 pp.]. doi:10.2903/j.efsa.2010.1706. Available online: www.efsa.europa.eu
- Escalera, L., G. Benvenuto, E. Scalco, A. Zingone et M. Montresor. 2014. "Ultrastructural features of the benthic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* (Dinophyceae)." *Protist* 165 (3): 260-274. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2014.03.001>.
- Fraga, M., N. Vilariño, M. C. Louzao, L. Molina, Y. López, M. Poli et L. M. Botana. 2017. "First Identification of Palytoxin-Like Molecules in the Atlantic Coral Species *Palythoa canariensis*." *Analytical Chemistry* 89 (14): 7438-7446. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01003>.
- Fujiki, H., M. Suganuma, M. Nakayasu, H. Hakii, T. Horiuchi, S. Takayama et T. Sugimura. 1986. "Palytoxin is a non-12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate type tumor promoter in two-stage mouse skin carcinogenesis." *Carcinogenesis* 7 (5): 707-710. <https://doi.org/10.1093/carcin/7.5.707>.
- Funari, E., M. Manganelli et E. Testai. 2015. "Ostreopsis cf. *ovata* blooms in coastal water: Italian guidelines to assess and manage the risk associated to bathing waters and recreational activities." *Harmful Algae* 50: 45-56. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.10.008>.
- Gemin, M. P. 2020a. "Effets in situ et in vitro des paramètres environnementaux sur l'abondance, le métabolome et le contenu toxique de l'*Ostreopsis* cf. *ovata* et purification des ovatoxines." <http://www.theses.fr/2020NANT4059>. <http://www.theses.fr/2020NANT4059/document>.
- Gémin, M. P., D. Réveillon, F. Hervé, A. S. Pavaux, M. Tharaud, V. Séchet, S. Bertrand, R. Lemée et Z. Amzil. 2020b. "Toxin content of *Ostreopsis* cf. *ovata* depends on bloom phases, depth and macroalgal substrate in the NW Mediterranean Sea." *Harmful Algae* 92. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101727>.
- Honsell, G., M. De Bortoli, S. Boscolo, C. Dell'Aversano, C. Battocchi, G. Fontanive, A. Penna, F. Berti, S. Sosa, T. Yasumoto, P. Ciminiello, M. Poli et A. Tubaro. 2011. "Harmful dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* Fukuyo: Detection of ovatoxins in field samples and cell immunolocalization using antipalytoxin antibodies." *Environmental Science and Technology* 45 (16): 7051-7059. <https://doi.org/10.1021/es201373e>.
- Illoul, H., F. Rodríguez, M. Vila, N. Adjias, A. A. Younes, M. Bournissa, A. Koroghli, N. Marouf, S. Rabia et F. L. K. Ameer. 2012. "The genus *Ostreopsis* along the algerian coastal waters (SW Mediterranean Sea) associated with a human respiratory intoxication episode." *Cryptogamie, Algologie* 33 (2): 209-216. <https://doi.org/10.7872/crya.v33.iss2.2011.209>.
- Laza-Martinez, A., E. Orive et I. Miguel. 2011. "Morphological and genetic characterization of benthic dinoflagellates of the genera *Coelia*, *Ostreopsis* and *Prorocentrum* from the south-eastern bay of Biscay." *European Journal of Phycology* 46 (1): 45-65. <https://doi.org/10.1080/09670262.2010.550387>.
- Mangialajo, L., R. Bertolotto, R. Cattaneo-Vietti, M. Chiantore, C. Grillo, R. Lemée, N. Melchiorre, P. Moretto, P. Povero et N. Ruggieri. 2008. "The toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata*: Quantification of proliferation along the coastline of Genoa, Italy." *Marine Pollution Bulletin* 56 (6): 1209-1214. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.02.028>.
- Mangialajo, L., N. Ganzin, S. Accoroni, V. Asnaghi, A. Blanfuné, M. Cabrini, R. Cattaneo-Vietti, F. Chavanon, M. Chiantore, S. Cohu, E. Costa, D. Fornasaro, H. Grossel, F. Marco-Miralles, M. Masó, A. Reñé, A. M. Rossi, M. M. Sala, T. Thibaut, C. Totti, M. Vila et R. Lemée. 2011. "Trends in *Ostreopsis* proliferation along the Northern Mediterranean coasts." *Toxicon* 57 (3): 408-420. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.11.019>.
- Mobasheri, A., J. Avila, I. Cózar-Castellano, M. D. Brownleader, M. Trevan, M. J. Francis, J. F. Lamb et P. Martín-Vasallo. 2000. "Na⁺, K⁺-ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions." *Biosci Rep* 20 (2): 51-91. <https://doi.org/10.1023/a:1005580332144>.

- Paradis, C. et M. Labadie. 2022. Effets sanitaires liés à la présence de microalgues du genre *Ostreopsis* sur la côte basque au cours de l'été 2021. Rapport du CHU/Centre Antipoison de Bordeaux, 33 pages.
- Patocka, J., E. Nepovimova, Q. Wu et K. Kuca. 2018. "Palytoxin congeners." *Archives of Toxicology* 92 (1): 143-156. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2105-8>.
- Pavaux, A.S., D. Velasquez-Carjaval, K. Drouet, A. Lebrun, A. Hiroux, S. Marro, E. Christians, S. Castagnetti et R. Lemée. 2021. "Daily variations of *Ostreopsis* cf. *ovata* abundances in NW Mediterranean Sea." *Harmful Algae* 110. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2021.102144>.
- Pelin, M., V. Brovedani, S. Sosa et A. Tubaro. 2016. "Palytoxin-containing aquarium soft corals as an emerging sanitary problem." *Marine Drugs* 14 (2). <https://doi.org/10.3390/md14020033>.
- Poli, M., P. Ruiz-Olvera, A. Nalca, S. Ruiz, V. Livingston, O. Frick, D. Dyer, C. Schellhase, J. Raymond, D. Kulis, D. Anderson, S. McGrath et J. Deeds. 2018. "Toxicity and pathophysiology of palytoxin congeners after intraperitoneal and aerosol administration in rats." *Toxicon* 150: 235-250. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.06.067>.
- Scheiner-Bobis, G., T. Hübschle et M. Diener. 2002. "Action of palytoxin on apical H⁺/K⁺-ATPase in rat colon." *European Journal of Biochemistry* 269 (16): 3905-3911. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03056.x>.
- Sosa, S., G. Del Favero, M. De Bortoli, F. Vita, M. R. Soranzo, D. Beltramo, M. Ardizzone et A. Tubaro. 2009. "Palytoxin toxicity after acute oral administration in mice." *Toxicology Letters* 191 (2-3): 253-259. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.09.009>
- Takeuchi, A., N. Reyes, P. Artigas et D. C. Gadsby. 2009. "Visualizing the mapped ion pathway through the Na,K-ATPase pump." *Channels* 3 (6): 383-386. <https://doi.org/10.4161/chan.3.6.9775>.
- Tartaglione, L., E. Dello Iacovo, A. Mazzeo, S. Casabianca, P. Ciminiello, A. Penna et C. Dell'Aversano. 2017. "Variability in Toxin Profiles of the Mediterranean *Ostreopsis* cf. *ovata* and in Structural Features of the Produced Ovatoxins." *Environmental Science and Technology* 51 (23): 13920-13928. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03827>.
- Taylor, F.J.R. 1979. "Description of the benthic dinoflagellate [Algae] associated with maitotoxin and ciguatoxin, including observations on Hawaiian material. Toxic Dinoflagellate Blooms., Elsevier Scientific, New York (1979), pp. 71-76."
- Tognetto, L., S. Bellato, I. Moro et C. Andreoli. 1995. "Occurrence of *Ostreopsis ovata* (Dinophyceae) in the Tyrrhenian Sea during Summer 1994." *Botanica Marina* 38 (1-6): 291-296. <https://doi.org/10.1515/botm.1995.38.1-6.291>.
- Tubaro, A., G. Del Favero, D. Beltramo, M. Ardizzone, M. Forino, M. De Bortoli, M. Pelin, M. Poli, G. Bignami, P. Ciminiello et S. Sosa. 2011. "Acute oral toxicity in mice of a new palytoxin analog: 42-Hydroxy-palytoxin." *Toxicon* 57 (5): 755-763. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.02.009>.
- Turki, S., A. Harzallah et C. Sammari. 2006. "Occurrence of harmful dinoflagellates in two different Tunisian ecosystems: The lake of Bizerte and the gulf of Gabès." *Cahiers de Biologie Marine* 47 (3): 253-259.
- Vila, M., E. Garcés et M. Masó. 2001. "Potentially toxic epiphytic dinoflagellate assemblages on macroalgae in the NW Mediterranean." *Aquatic Microbial Ecology* 26 (1): 51-60. <https://doi.org/10.3354/ame026051>.
- Walsh, J. J., J. M. Lenes, R. H. Weisberg, L. Zheng, C. Hu, K. A. Fanning, R. Snyder et J. Smith. 2017. "More surprises in the global greenhouse: Human health impacts from recent toxic marine aerosol formations, due to centennial alterations of world-wide coastal food webs." *Marine Pollution Bulletin* 116 (1-2): 9-40. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.12.053>.
- Wiles, J. S., J. A. Vick et M. K. Christensen. 1974. "Toxicological evaluation of palytoxin in several animal species." *Toxicon* 12 (4): 427-433. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(74\)90011-7](https://doi.org/10.1016/0041-0101(74)90011-7).

ANNEXE 1

Présentation des intervenants

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

Groupe de travail

Président

M. Rodolphe LEMEE – Professeur à Sorbonne Université– Directeur du Laboratoire d'Océanographie de Villefranche (LOV, UMR 7093 CNRS-Sorbonne Université) – Compétences en microalgues toxiques et nuisibles, *Ostreopsis*.

Vice-Président

M. Jean-François HUMBERT – Directeur de recherche – Institut d'écologie et des sciences de l'environnement de Paris (iEES), Institut de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement (INRAE), Paris – Compétences en microbiologie de l'eau, cyanobactéries, écologie microbienne.

Membres

M. Eric ABADIE – Chercheur, Ifremer/BIODIVENV, Le Robert, Martinique – Compétences en écophysiologie et écologie des dinoflagellés, biotoxines marines, Réseau de surveillance et d'observation du phytoplancton et des phycotoxines.

M. Zouher AMZIL – Chercheur habilité à diriger des recherches, Ifremer, Nantes – Compétences en microalgues toxiques et nuisibles, chimie des phycotoxines marines & cyanotoxines – Coordinateur national du réseau de veille d'émergence des biotoxines marines dans les coquillages (EMERGTOX).

Mme Elisa BERDALET – Chercheuse à l'ICM-CSIC (Institut des Sciences de la Mer, Conseil Supérieur de la Recherche Scientifique), Docteur, Barcelone, Espagne – Compétences en microalgues toxiques et nuisibles, *Ostreopsis*.

M Ronel BIRÉ – Chargé de projet à l'Anses, Laboratoire de Sécurité des Aliments, UPBM Unité Pesticides et Biotoxines marines, Maisons-Alfort – Compétences en chimie analytique des biotoxines marines.

Mme Marie-Yasmine DECHRAOUI BOTTEIN – Professeur des universités – Université Côte d'Azur, laboratoire ECOSEAS (Ecology and Conservation Science for Sustainable Seas) – Compétences en toxicologie des biotoxines marines, méthodes analytiques, écotoxicologie.

M Luc DE HARO – Médecin toxicologue clinicien, praticien hospitalier, Hôpital Sainte Marguerite, Centre antipoison de Marseille – Compétences en toxicologie clinique des biotoxines marines.

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

Mme Valérie FESSARD – Chef d'unité au Laboratoire de l'Anses à Fougères – Compétences en toxicologie.

M Jean-Philippe JAEG – Maître de conférences, Ecole nationale vétérinaire de Toulouse. Compétences en toxicologie, toxicologie clinique vétérinaire, sécurité chimique des aliments.

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

Mme Anne OPPLIGER – Responsable de recherche au Centre universitaire de médecine générale et de Santé publique de Lausanne – Compétences en aérosols.

Mme Anne-Sophie PAVAU – Post-doctorante au laboratoire LGPM (Laboratoire de Génie des Procédés et Matériaux) de CentraleSupélec – Compétences en écologie chimique marine, *Ostreopsis*.

Mme Eva TERNON – Post-doctorante jusqu'en octobre 2022 au Laboratoire d'Océanographie de Villefranche (LOV, UMR 7093 CNRS-Sorbonne Université) – Compétences en chimie d'*Ostreopsis* (particulaire, dissous, aérosols) et écologie chimique.

▪ **Comité d'experts spécialisé : CES « Eaux »**

Président

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

Vice-président

M. Jean-François HUMBERT – Directeur de recherche – Institut d'écologie et des sciences de l'environnement de Paris (iEES), Institut de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement (INRAE), Paris – Microbiologie de l'eau dont cyanobactéries, écologie microbienne.

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

Membres

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

M. Olivier HORNER – Professeur – École polytechnique féminine, Paris – Chimie de l'eau, traitement des eaux.

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

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

Mme Sophie LARDY-FONTAN – Directrice du laboratoire d'hydrologie de Nancy – Métrologie, chimie analytique, micropolluants, ultratrace, assurance qualité/contrôle qualité (QA/QC).

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

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

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

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

Mme Fabienne PETIT – Professeur – Université de Rouen – Écologie microbienne.

Mme Catherine QUIBLIER – Professeure – Université Paris Cité – Museum National d'Histoire Naturelle – Écologie des milieux aquatiques, Écologie et toxicité des cyanobactéries planctoniques et benthiques, surveillance.

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

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

Mme Michèle TREMBLAY – Docteur en médecine spécialiste en santé communautaire / Médecin conseil en santé au travail et en maladies infectieuses – retraitée – Santé travail, microbiologie de l'eau.

▪ **CES « Évaluation des risques physico-chimiques dans les aliments » (CES ERCA 2022-2026)**

Président

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

Vice-présidente

Mme Marie-Louise SCIPPO - Professeur des universités - Compétences en chimie analytique et évaluation des risques.

Membres

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

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

Mme Marie-Yasmine BOTTEIN – Chercheur en toxicologie environnementale - Compétences en biotoxines marines.

Mme Rachida CHEKRI – Responsable de laboratoire – Compétences en chimie analytique.

M. Nicolas DELCOURT – Maître de conférences des universités, pharmacien hospitalier - Compétence en toxicologie clinique.

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

Mme Virginie DESVIGNES – Ingénieure Recherche – Compétences en évaluation des expositions et des risques.

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

M. Gautier EPPE – Professeur des universités – Compétences en chimie analytique.

Mme Anne-Sophie FICHEUX – Ingénieur de recherche – Compétences en toxicologie.

M. Eric HOUDEAU – Directeur de recherche – Compétences en toxicologie.

M. Jean-Philippe JAEG – Maître de conférence – Compétences en toxicologie et alimentation animale.

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

M. Olivier LAPREVOTE – Professeur des universités et Praticien Hospitalier – Compétences en toxicologie.

M. Michel LAURENTIE – Directeur de recherche – Compétences en pharmacocinétique.

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

M. Jean-Charles LEBLANC – Chef d'unité – Compétences en évaluation des expositions et des risques.

M. Nicolas LOISEAU – Chargé de recherche – Compétences en biochimie.

M. David MAKOWSKI – Directeur de recherche – Compétences en statistiques, modélisation.

Mme Francesca MANCINI – Chargée de recherche – Compétences en épidémiologie.
M. Eric MARCHIONI – Professeur des universités – Compétences en chimie analytique.
M. Jean-François MASFARAUD - Maître de conférences des universités - Compétences en transfert des contaminants.
Mme Mathilde MUNIER – Chercheur hospitalier – Compétences en toxicologie.
Mme Isabelle OSWALD – Directrice de recherche – Compétences en toxicologie.
Mme Anne PLATEL – Maître de conférences des universités – Compétences en toxicologie.
M. Yann SIVRY – Maître de conférences des universités – Compétences en transfert des contaminants.
Mme Paule VASSEUR – Professeur émérite – Compétences en toxicologie.

PARTICIPATION ANSES

Coordination et contribution scientifiques

Mme Carole CATASTINI – coordinatrice d'expertise scientifique – Unité d'Évaluation des risques liés à l'eau, Direction de l'évaluation des risques.
Mme Nathalie ARNICH – adjointe au chef de l'unité d'Évaluation des risques liés aux aliments, Direction de l'Évaluation des Risques.
Mme Estelle CHECLAIR-WESTERBERG -- coordinatrice d'expertise scientifique – Unité d'Évaluation des risques liés à l'eau, Direction de l'évaluation des risques.
Mme Eleonore NEY– cheffe de l'unité d'Évaluation des risques liés à l'eau, Direction de l'évaluation.

Secrétariat administratif

Mme Françoise LOURENCO – Service d'Appui à l'expertise – Direction de l'Évaluation des Risques.

AUDITION DE PERSONNALITÉS EXTÉRIEURES

GIS Littoral basque

Mme Aurélie BOCQUET-ESCOURROU – Coordinatrice scientifique du GIS Littoral basque

ARS Nouvelle Aquitaine

M. Thomas MARGUERON – Responsable du pôle santé publique et santé environnementale

IFREMER

Mme Elvire Antajan, Laboratoire Environnement Ressources d'Arcachon

Centre antipoison et de toxicovigilance de Nouvelle-Aquitaine

Mme Magalie LABADIE – Médecin- chef de service

M. Camille PARADIS – Pharmacien

Une efflorescence d'*Ostreopsis* de moindre amplitude avait déjà été signalée pendant l'été 2020 sur la côte basque. Aucun cas humain n'avait été rapporté. Il est donc possible que le phénomène émergent devienne récurrent et puisse s'amplifier. Par conséquent, l'expertise de l'Anses est rendue nécessaire par l'émergence de cette problématique sur la côte atlantique, alors qu'elle était jusque-là rencontrée sur le seul littoral méditerranéen, et par l'importance du nombre de cas signalés (le plus important de l'ensemble des épisodes rencontrés en France métropolitaine).

L'objectif est, d'une part, la mise à jour des données relatives aux microalgues du genre *Ostreopsis* et, d'autre part, l'établissement de recommandations spécifiques à la côte atlantique ainsi que, si cela s'avère opportun, la mise à jour des recommandations spécifiques à la côte méditerranéenne établies en 2007-2008. Enfin, cette saisine porte sur les risques sanitaires liés aux diverses voies d'exposition : par l'air (exposition aux embruns), par la consommation de produits de la mer contaminés et par les activités aquatiques, tout en prenant en considération les particularités liées à la protection des travailleurs concernés.

Contexte :

Les dinoflagellés du genre *Ostreopsis* sont connus en zones côtières tropicales pour être à l'origine d'intoxications alimentaires (souvent mortelles) suite à l'accumulation de la palytoxine et /ou de ses analogues (palytoxines-like) dans des crabes, des oursins ou des poissons. Probablement en lien avec le changement climatique, *Ostreopsis* spp. est de plus en plus présent en Méditerranée nord occidentale (Italie, Espagne, Grèce).

Avant septembre 2020, la présence de micro-algues du genre *Ostreopsis* n'était connue en métropole que sur la côte méditerranéenne. En 2006, année de la première prolifération d'*Ostreopsis* sp en Méditerranée, les signalements de cas d'irritation cutanéomuqueuse chez des plongeurs avaient conduit à réaliser des analyses d'eau, révélant la présence d'*Ostreopsis ovata*. Cette espèce, alors émergente en Méditerranée, est capable de produire une toxine appartenant à la famille des « palytoxine-like ».

La palytoxine est une toxine très puissante produite par des coraux mous et par certaines espèces d'*Ostreopsis*. D'autres toxines analogues à la palytoxine mais moins toxiques sont également produites par des espèces d'*Ostreopsis*. Les « palytoxines-like » regroupent ainsi 8 analogues : la palytoxine au sens strict (*a priori* la plus toxique), l'ostreocinè-D, l'ovatoxine-A, l'homopalytoxine, la bishomopalytoxine, la neopalytoxine, la deopalytoxine et la 42-hydroxypalytoxine.

Par ailleurs, les données acquises, durant les blooms estivaux d'*Ostreopsis* cf. *ovata* de 2008 et 2009, montrent qu'il existe un danger réel d'intoxication humaine suite à la mise en évidence d'une bio-accumulation des PLT-like (palytoxine + ovatoxine-a) aussi bien dans les bivalves filtreurs (moules immergées) que dans les échinodermes herbivores (oursins). La teneur totale en PLT-like accumulée dans les oursins a atteint 450 µg eq PLT/kg de chair totale (été 2008). Concernant les moules, la teneur maximale était de 230 µg eq PLT/kg (été 2009) pour un maximum de 360 µg trouvé dans les oursins durant la même période au niveau du même site.

La palytoxine s'accumulant potentiellement dans les produits de la mer, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (devenue Anses) avait été saisie pour établir un bilan des connaissances réparti dans deux avis scientifiques et techniques :

- L'avis scientifique et technique du 22/08/2007 (saisine n°2007-SA-0227¹) apporte des bilans de connaissance relatives :
 - o aux toxines produites par les microalgues du genre *Ostreopsis* (dont *ovata* et *siamensis*) ;
 - o à la possibilité de transfert dans la chaîne alimentaire des toxines produites par les microalgues du genre *Ostreopsis* ;
 - o aux méthodes d'analyse, biologiques et physicochimiques, utilisables en routine ou en développement (recherche) ;
 - o aux seuils de toxicité connus, et l'Afssa avait conclu qu'il n'en existait pas pour la palytoxine et les palytoxine-like.

¹ <https://www.anses.fr/fr/system/files/RCCP2007sa0227.pdf>

- L'avis du 11/07/2008 (saisine n°2007-SA-0303² liée à la saisine précédente) apporte les informations complémentaires relatives :
 - o à des pistes d'amélioration du dispositif de surveillance d'*Ostreopsis* spp dans le milieu marin et dans les aliments ;
 - o aux études nécessaires pour mieux caractériser le risque alimentaire.

Par ailleurs, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) a rendu en 2009 un avis sur les toxines de la famille des « palytoxine-like »³. L'avis souligne le manque de données de toxicité, mais propose une dose de toxicité aiguë (ARfD) de 0,2 µg/kg de poids corporel, ce qui correspond à un seuil dans l'aliment à ne pas dépasser de 30 µg/kg (somme de la palytoxine et de l'ostréocine-D).

A la lumière des avis de l'Afssa sus-visés et afin de prévenir la survenue de cas d'intoxication liés à la présence d'*Ostreopsis ovata* en Méditerranée, une note de service DGS⁴ a été diffusée courant septembre 2010. Cette instruction propose des modalités de surveillance, de gestion des efflorescences et de communication. Toutefois, si elle cible l'ensemble des espèces du groupe *Ostreopsis*, elle ne porte que sur la problématique rencontrée en Méditerranée, rendant difficile son application lors de l'épidémie survenue sur la côte basque en août dernier. Une mise à jour de celle-ci pourrait donc s'avérer nécessaire, impliquant une actualisation des connaissances scientifiques relatives aux *Ostreopsis* spp et à leurs toxines.

Portée de la saisine :

Conformément à l'article R. 1313-1 du code de la santé publique, nous sollicitons donc l'Anses pour répondre aux questions suivantes :

- Quelles sont les nouvelles données scientifiques publiées depuis les précédents avis, relatives à la fois aux microalgues du genre *Ostreopsis*, et également aux toxines qu'elles produisent ? Quels sont les niveaux de toxicité connus pour les différentes toxines produites ? Quelles sont les conditions favorables pour que les microalgues du genre *Ostreopsis* libèrent des toxines ? L'intoxication humaine est-elle liée à une exposition directe aux toxines, ou survient-elle lors de l'exposition aux microalgues qui produisent ensuite les toxines ? Quels sont les risques pour les différents usagers de la mer selon les différentes voies d'exposition (alimentaire, activités aquatiques, embruns) ?
- Quelles sont les conditions environnementales favorables au développement des différentes espèces du genre *Ostreopsis* ? Quelle est la répartition et la dynamique des populations d'*Ostreopsis* sur les côtes françaises ? Est-il envisageable à court ou moyen terme d'établir une cartographie du risque d'efflorescence d'*Ostreopsis* spp. sur les côtes métropolitaines ? Un plan exploratoire est-il nécessaire pour établir cette cartographie ? Si oui, quelles devraient en être les lignes directrices ?
- Sur la base de l'expérience acquise en Méditerranée, quelles sont les préconisations en matière de méthodologie de prélèvement et d'analyse pour surveiller l'apparition d'*Ostreopsis* sur la côte atlantique ? Dans quelles conditions la recherche du paramètre « *Ostreopsis* spp. » doit-elle être intégrée au contrôle sanitaire des eaux de baignade ?
- Quel est le seuil de concentration d'*Ostreopsis* dans l'eau / de toxines dans l'air ou les aliments devant déclencher une alerte sur la côte atlantique ? Quelles sont les recommandations en matière de mesures de gestion en cas de dépassement de ces seuils ? Existe-t-il des espèces indicatrices, plus aisément identifiables en routine, susceptibles d'alerter sur la présence de microalgues du genre *Ostreopsis* ?
- Existe-t-il dans d'autres pays des méthodes de détection rapides qui pourraient être mises en œuvre pour identifier la toxine en cause lors d'une épidémie ?

² <https://www.anses.fr/fr/system/files/RCCP2007sa0303.pdf>

³ <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2009.1393>

⁴ Note de service DGS/EA3/EA4 n° 2010-238 du 30 juin 2010 relative à la surveillance sanitaire et environnementale et aux modalités de gestion des risques sanitaires pour la saison balnéaire 2010, liés à la présence de la microalgue toxique *Ostreopsis* spp. dans les eaux de baignade en méditerranée et à la contamination par ses toxiques des produits de la mer issus de la pêche de loisir : https://solidarites-sante.gouv.fr/fichiers/bo/2010/10-08/stc_20100008_0100_0161.pdf

- En matière de sécurité des travailleurs, quelles sont les recommandations spécifiques pour éviter une exposition chronique en cas d'efflorescence ?

Délai souhaité :

Afin d'anticiper au mieux les risques potentiels d'intoxication au cours de l'été 2022 et en l'absence de recommandations existantes pour la côte atlantique, une réponse est souhaitée au plus tard le 1/04/2022. L'agence demeure libre de répartir les différentes questions sous plusieurs numéros de saisine, et pourra en particulier rendre son avis sur la mise à jour des recommandations pour la côte méditerranéenne dans un second temps.

Nos services se tiennent à votre disposition pour vous apporter toute information complémentaire.

Nous vous remercions de bien vouloir accuser réception de la présente demande en nous précisant le ou les comités d'experts spécialisés qui sont saisis du dossier.

Le directeur général
de l'alimentation

Bruno FERREIRA

BRUNO
FERREIR
A ID

Signature
numérique de
BRUNO FERREIRA
ID
Date : 2021.12.03
09:11:27 +01'00'

Le directeur général
de la santé

Jérôme SALOMON



ANNEXE 3- LISTE DES BESOINS DE RECHERCHE

RECHERCHES EN RELATION AVEC LA DIVERSITE, LA DISTRIBUTION, L'ÉCOLOGIE ET LA SURVEILLANCE D'*OSTREOPSIS*

Améliorer les connaissances sur la diversité et la biogéographie d'*Ostreopsis*

Certaines espèces du genre *Ostreopsis* ne sont pas encore décrites morphologiquement ni génétiquement et d'autres ont une position taxonomique incertaine. Il est important d'améliorer les connaissances sur la description de ces taxa et sur leur phylogénie, à la fois en zones tempérées et tropicales. Ces études permettront de pouvoir mieux documenter les aires de distribution géographique des différentes espèces et leur évolution dans le futur.

En France métropolitaine, il est particulièrement important :

- de préciser le statut taxonomique d'*Ostreopsis* cf. *ovata* et d'*Ostreopsis* cf. *siamensis* ;
- de suivre l'évolution de leurs aires de distribution le long de la côte atlantique sur des sites sentinelles ;
- de confirmer ou infirmer l'absence d'*O.* cf. *siamensis* sur la côte méditerranéenne française.

Améliorer les connaissances sur l'écologie d'*Ostreopsis*

D'autre part, il est nécessaire d'améliorer les connaissances sur :

- les facteurs et processus (changement climatique et autres pressions d'origine anthropique)-favorisant les proliférations d'*Ostreopsis* en zones tempérées ;
- la dynamique spatiale et temporelle du développement des cellules planctoniques d'*Ostreopsis* et des biofilms sur les substrats en fonction des facteurs et processus abiotiques et biotiques ; pour les biofilms, une attention particulière devra être portée sur les phanérogames présents sur la côte de la Nouvelle-Aquitaine ;
- les facteurs et processus qui conduisent au détachement des biofilms de leurs substrats ;
- la production, la composition et le rôle du mucus dans la prolifération des deux espèces d'*Ostreopsis* présentes en France ;
- le déterminisme des migrations verticales des cellules d'*Ostreopsis* qui surviennent au cours de la journée entre les substrats benthiques et la colonne d'eau en utilisant par exemple des approches expérimentales en micro/mésocosmes ;
- la compétition entre *O.* cf. *ovata* et *O.* cf. *siamensis* en fonction des conditions environnementales afin de pouvoir prédire l'espèce qui sera favorisée sur les sites impactés ;
- le développement de modèles prédictifs de la dynamique des populations d'*Ostreopsis*.

Développer de nouvelles stratégies et des outils pour la surveillance d'*Ostreopsis*

De nouvelles approches devront être développées et standardisées pour améliorer la surveillance des proliférations d'*Ostreopsis*. C'est ainsi qu'il serait intéressant de travailler sur :

- la mise au point et la validation d'une méthodologie permettant d'estimer (i) la couverture (pourcentage de recouvrement) des substrats par les biofilms d'*Ostreopsis* à l'échelle des sites étudiés et (ii) l'étendue et la densité de fleurs d'eau à *Ostreopsis* ;

- la mise au point et la validation d'outils moléculaires (ex : PCR quantitative) pour estimer rapidement l'abondance des différentes espèces d'*Ostreopsis* dans les compartiments planctonique et benthique et en surface de la colonne d'eau (fleurs d'eau) ;
- la validation de méthodes d'échantillonnage à partir de substrats naturels ou artificiels, et de dénombrement des cellules (ex : cytométrie) ;
- la sélection de la méthode de prélèvement des aérosols d'*Ostreopsis* la plus efficace ;
- le développement d'approches en sciences participatives impliquant les professionnels (pêcheurs, plagistes, surveillants de baignade, etc.) et le grand public, pour la surveillance des populations benthiques et des fleurs d'eau d'*Ostreopsis*.

RECHERCHES EN RELATION AVEC LES TOXINES PRODUITES PAR *OSTREOPSIS* ET LEURS IMPACTS

Améliorer les connaissances sur la diversité et la régulation de la production des toxines produites par *Ostreopsis*

Pour mieux connaître le potentiel toxique d'*Ostreopsis*, il est nécessaire de :

- poursuivre l'identification et la caractérisation de l'ensemble des toxines produites par les espèces du genre *Ostreopsis* et décrire leurs voies de biosynthèse ;
- déterminer s'il existe, dans les populations d'*Ostreopsis*, des génotypes producteurs de toxines et d'autres qui ne le sont pas, faute de posséder les gènes permettant leur biosynthèse. Si ces deux types de génotypes coexistent au sein des populations, il faudra étudier les variations de leurs proportions et les facteurs et processus qui influencent ces variations ;
- déterminer les facteurs et processus biotiques et abiotiques qui régulent la production et la sécrétion des toxines produites par les différentes espèces d'*Ostreopsis*.

Améliorer les connaissances sur le comportement des toxines et les processus de transfert

- étudier le devenir des toxines (stabilité, dégradation, diffusion, transfert) dans les différents compartiments abiotiques (eau, air et sédiments, sachant qu'il n'existe actuellement aucune donnée sur leur présence éventuelle dans ce dernier compartiment) ;
- étudier le transfert potentiel et la biodisponibilité de ces toxines dans les réseaux trophiques ;
- confirmer la présence de toxines extracellulaires adsorbées au mucus.(Ciminiello *et al.* 2006).

Développer de nouvelles stratégies et des nouveaux outils pour la surveillance des toxines d'*Ostreopsis*

Pour améliorer la surveillance des toxines et ainsi limiter l'exposition des populations humaines à ces substances, il faut mettre en œuvre des travaux sur :

- la mise au point de méthodes rapides de surveillance (ex : ELISA) des toxines du groupe de la PLTX sur les sites côtiers favorables aux proliférations d'*Ostreopsis* ;

- l'amélioration des techniques d'échantillonnage passif (ex : SPATT) permettant de concentrer *in situ* des toxines présentes en faibles concentrations dans l'eau de mer afin de disposer de données sur les toxines extracellulaires en milieu naturel ;
- la mise au point et la validation de matériels et de méthodes pour piéger puis quantifier les toxines d'*Ostreopsis* présentes dans les aérosols ;
- la recherche de biomarqueurs, de bioindicateurs ou d'espèces sentinelles qui pourraient permettre une détection précoce de la présence d'*Ostreopsis* et/ou de ses toxines.

Améliorer et développer des méthodes permettant l'analyse dans différents compartiments (microalgues, eau, aérosols, produits de la mer)

Il est nécessaire, pour tous les compartiments, de :

- optimiser les protocoles de purification des toxines du groupe de la PLTX ;
- développer des matériaux de référence certifiés de type étalons de haute pureté et matériaux à matrices avec des concentrations connues en toxines du groupe de la PLTX ;
- optimiser, valider et normaliser les méthodes analytiques permettant d'identifier et de quantifier les toxines d'*Ostreopsis* dans les différentes matrices (eau, air, produits de la mer) ;
- développer des méthodes de détection des composés toxiques en temps réel.

Améliorer les connaissances concernant les toxines dans les aérosols et les produits de la mer)

Il faudra en particulier pour les aérosols :

- caractériser les paramètres physico-chimiques des aérosols (concentration, granulométrie, composition chimique) ;
- étudier quels sont les facteurs (biotiques et abiotiques) favorisant l'aérosolisation des composés toxiques ;
- étudier la chemodiversité des aérosols en particulier les composés à caractère toxique et identifier les composés responsables des symptômes observés ;
- élaborer des modélisations du transport des aérosols marin en fonction de divers paramètres physiques et biologiques.

Il est nécessaire pour les produits de la mer consommés de :

- développer des procédés de culture en grand volume afin d'obtenir de la biomasse de cellules d'*Ostreopsis* nécessaire pour étudier expérimentalement les cinétiques de contamination et de décontamination des produits de la mer, l'organotropisme, les produits du métabolisme ;
- étudier le lien entre la contamination des produits de la mer et la dynamique des proliférations d'*Ostreopsis* dans le milieu naturel ;
- déterminer la cause des mortalités de certains organismes marins associées aux proliférations d'*Ostreopsis* en Méditerranée et sur la côte atlantique ;
- acquérir des données de contamination des produits de la mer par les toxines du groupe de la PLTX avec des méthodes robustes et des LD/LQ en adéquation avec la valeur guide afin de pouvoir réaliser une estimation de l'exposition alimentaire et une caractérisation du risque ;

- étudier les effets de la cuisson sur les toxines du groupe de la PLTX dans les produits de la mer ;
- mener des études d'écotoxicologie pour évaluer l'impact des proliférations d'*Ostreopsis* sur les organismes marins.

Améliorer les connaissances sur la toxicité des toxines produites par *Ostreopsis*

Les études relatives à la toxicité des toxines sont limitées par la disponibilité de ces composés. Il s'agira donc de privilégier dans un premier temps la purification de ces composés et la réalisation d'études *in silico* et/ou *in vitro* nécessitant pas ou peu de matériel. Des études complémentaires avec la PLTX, disponible commercialement et utilisée comme un proxy, permettront d'extrapoler les résultats aux autres toxines appartenant au groupe de la PLTX. Pour les toxines d'*Ostreopsis* qui ne sont pas du groupe de la PLTX, il n'existe pas de composés identifiés pouvant servir de proxy.

Afin de pouvoir réaliser des tests de toxicité réglementaires (principalement réalisés chez l'animal), il est nécessaire avant tout de pouvoir disposer de toxines purifiées en quantité suffisante. Leur disponibilité très restreinte limitera les études qui pourront être réalisées.

Les tests de toxicité (si possible suivant les lignes directrices de l'OCDE) nécessaires pour mener une évaluation du risque sanitaire concernant :

- la toxicité aiguë et répétée par inhalation ;
- la toxicité aiguë par voie orale pour OVTX-a et OST-D ;
- la toxicité répétée par voie orale ;
- l'irritation oculaire et cutanée et de sensibilisation cutanée à l'aide de tests *in vitro* ;
- la génotoxicité *in vitro* puis *in vivo* si besoin ;
- la cancérogénèse avec par exemple des essais de transformation cellulaire pour l'aspect promoteur tumoral ;
- la reprotoxicité ;
- l'immunotoxicité ;
- la toxicité sur le développement et le neuro-développement.

Afin de déterminer les mécanismes d'action des toxines, il est important de :

- déterminer l'action des toxines du groupe de la PLTX sur la Na/K ATPase et de comparer leur affinité avec celle de PLTX ;
- déterminer l'action des toxines du groupe de la PLTX sur les autres pompes de type H⁺ ATPase ;
- évaluer les Facteurs d'Equivalence Toxique (TEF) des toxines du groupe de la PLTX ;
- réaliser des études complémentaires *in vitro* et/ou *in vivo* pour déterminer les cibles moléculaires et les mécanismes d'action de l'ensemble des toxines produites par *Ostreopsis*, afin de prédire les pathologies attendues selon les différentes voies d'exposition.

Afin d'étudier la cinétique des toxines, il faut :

- identifier les métabolites formés et les enzymes impliquées, en particulier au niveau du foie, et évaluer la toxicité des métabolites principaux ;

- déterminer les paramètres cinétiques nécessaires à la construction de modèles toxicocinétiques selon les différentes voies d'exposition ;
- évaluer l'impact de la digestion sur l'accessibilité des toxines à l'aide des systèmes de digestion *in vitro*, pouvant intégrer également le microbiote en particulier pour rechercher les causes d'une toxicité moindre de la PLTX par voie orale comparé à l'inhalation.

RECHERCHE EN LIEN AVEC L'EXPOSITION ET LES EFFETS D'OSTREOPSIS SUR LES POPULATIONS

Il conviendra de :

- réaliser des études sur la gravité et la variabilité interannuelle des symptômes chez les professionnels et les populations riveraines, ce qui permettra notamment de détecter un éventuel effet cumulatif ou une éventuelle sensibilisation de ces populations ;
- rechercher des biomarqueurs d'exposition et d'effets aux composés produits par *Ostreopsis* chez l'Homme.

ANNEXE 4- MODIFICATIONS APPORTEES A LA VERSION DE L'AVIS DU 12 MAI 2023

| Numéro de page | Modification effectuée |
|----------------|--|
| 2 | <p>La phrase :</p> <p>« Le bilan épidémiologique montre que près de 900 personnes ont développé des signes et des symptômes associés aux proliférations d'<i>Ostreopsis</i> sur la côte basque française depuis 2020 (Paradis et Labadie 2022). »</p> <p>Est remplacée par :</p> <p>« Le bilan épidémiologique montre que 674 personnes ont développé des signes et des symptômes associés aux proliférations d'<i>Ostreopsis</i> sur la côte basque française durant l'été 2021 (Paradis et Labadie 2022). »</p> |
| 4 | <p>La note de bas de page indiquant que le rapport d'expertise collective serait publié ultérieurement est supprimée. La mention « daté de juin 2023 » a été ajoutée.</p> |
| 4 | <p>La phrase :</p> <p>« Ces travaux font l'objet d'un avis spécifique de l'Agence en cours de finalisation (Anses, 2023). »</p> <p>Est remplacée par :</p> <p>« Ils ont fait l'objet d'un avis spécifique de l'Agence publié en juin 2023 (Anses, 2023). »</p> |
| 4 | <p>La phrase :</p> <p>Le rapport d'expertise collective et l'avis produits par le groupe de travail « <i>Ostreopsis</i> » tiennent compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres des CES « EAUX » et « ERCA ».</p> <p>Est remplacée par :</p> <p>« Le rapport d'expertise collective ainsi que le chapitre « Analyse et conclusions » des experts produits par le groupe de travail « <i>Ostreopsis</i> » tiennent compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres des CES « EAUX » et « ERCA ».</p> |
| 5 | <p>La phrase : « La présente révision résulte de modifications éditoriales pour accompagner la publication du rapport, désormais finalisé, et d'une modification sur le dénombrement de cas. L'annexe 4 du présent avis rend compte des évolutions apportées à l'occasion de cette révision. »</p> <p>Est ajoutée.</p> |

| | |
|----|--|
| 5 | La phrase : « Le rapport sera publié postérieurement à cet avis. » est supprimée |
| 21 | La phrase « Le bilan épidémiologique réalisé sur près de 900 personnes intoxiquées lors des épisodes basques par le centre antipoison de Bordeaux montre que la voie principale d'exposition à <i>Ostreopsis</i> est l'inhalation d'aérosols marins contaminés, même si d'autres voies sont possibles (contact cutané, oculaire, ingestion d'eau). » Est remplacée par : « Le bilan épidémiologique réalisé en 2021 et 2022 sur 777 personnes intoxiquées lors des épisodes basques par le centre antipoison de Bordeaux montre que la voie principale d'exposition à <i>Ostreopsis</i> est l'inhalation d'aérosols marins contaminés, même si d'autres voies sont possibles (contact cutané, oculaire, ingestion d'eau). » |

Risques pour la santé humaine liés aux proliférations d'*Ostreopsis* spp. sur le littoral basque

**Saisine « 2021-SA-0212 »
Saisines liées « 2007-SA-0227 » et « 2007-SA-0303 »**

RAPPORT d'expertise collective

**Comité d'Experts Spécialisé (CES) « Eaux »
Comité d'Experts Spécialisé (CES) « ERCA »**

Groupe de travail « *Ostreopsis* »

Juin 2023

Citation suggérée

Anses. (2023). Risques pour la santé humaine liés aux proliférations d'*Ostreopsis* spp. sur le littoral basque. (saisine 2021-SA-0212). Maisons-Alfort : Anses, 244 p.

Mots clés

Ostreopsis, palytoxine, ovatoxines, ostréocines, toxines émergentes, biotoxines marines, coquillages, toxicité, occurrence, inhalation, embruns, eaux de baignade

Ostreopsis, *palytoxin*, *ovatoxins*, *ostreocins*, *emerging toxins*, *marine biotoxins*, *shellfish*, *toxicity*, *occurrence*, *inhalation*, *sea spray*, *recreational water*

Présentation des intervenants

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

GROUPE DE TRAVAIL

Président

M. Rodolphe LEMEE – Professeur à Sorbonne Université – Directeur du Laboratoire d'Océanographie de Villefranche (LOV, UMR 7093 CNRS-Sorbonne Université) – Compétences en microalgues toxiques et nuisibles, *Ostreopsis*.

Vice-Président

M. Jean-François HUMBERT – Directeur de recherche – Institut d'écologie et des sciences de l'environnement de Paris (iEES), Institut de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement (INRAE), Paris – Compétences en microbiologie de l'eau, cyanobactéries, écologie microbienne.

Membres

M. Eric ABADIE – Chercheur, Ifremer/BIODIVENV, Le Robert, Martinique – Compétences en écophysiologie et écologie des dinoflagellés, biotoxines marines, Réseau de surveillance et d'observation du phytoplancton et des phycotoxines.

M. Zouher AMZIL – Chercheur habilité à diriger des recherches, Ifremer, Nantes – Compétences en microalgues toxiques et nuisibles, chimie des phycotoxines marines & cyanotoxines – Coordinateur national du réseau de veille d'émergence des biotoxines marines dans les coquillages (EMERGTOX).

Mme Elisa BERDALET – Chercheuse à l'ICM-CSIC (Institut des Sciences de la Mer, Conseil Supérieur de la Recherche Scientifique), Docteur, Barcelone, Espagne – Compétences en microalgues toxiques et nuisibles, *Ostreopsis*.

M. Ronel BIRÉ – Chargé de projet à l'Anses, Laboratoire de Sécurité des Aliments, UPBM Unité Pesticides et Biotoxines marines, Maisons-Alfort – Compétences en chimie analytique des biotoxines marines.

Mme Marie-Yasmine DECHRAOUI BOTTEIN – Professeur des universités – Université Côte d'Azur, laboratoire ECOSEAS (Ecology and Conservation Science for Sustainable Seas) – Compétences en toxicologie des biotoxines marines, méthodes analytiques, écotoxicologie.

M. Luc DE HARO – Médecin toxicologue clinicien, praticien hospitalier, Hôpital Sainte Marguerite, Centre antipoison de Marseille – Compétences en toxicologie clinique des biotoxines marines.

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

Mme Valérie FESSARD – Chef d'unité au Laboratoire de l'Anses à Fougères – Compétences en toxicologie.

M. Jean-Philippe JAEG – Maître de conférences, école nationale vétérinaire de Toulouse. Compétences en toxicologie, toxicologie clinique vétérinaire, sécurité chimique des aliments.

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

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

Mme Anne-Sophie PAVAU – Post-doctorante au laboratoire LGPM (Laboratoire de Génie des Procédés et Matériaux) de CentraleSupélec – Compétences en écologie chimique marine, *Ostreopsis*.

Mme Eva TERNON – Chargée de recherche, Laboratoire d'Océanographie de Villefranche (LOV, UMR 7093 CNRS-Sorbonne Université) – Compétences en chimie d'*Ostreopsis* (particulaire, dissous, aérosols) et écologie chimique.

COMITÉ D'EXPERTS SPÉCIALISÉ

■ CES « Eaux »

Président

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

Vice-présidents

M. Jean-François HUMBERT – Directeur de recherche – Institut d'écologie et des sciences de l'environnement de Paris (iEES), Institut de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement (INRAE), Paris – Microbiologie de l'eau dont cyanobactéries, écologie microbienne.

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

Membres

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

M. Olivier HORNER – Professeur – École polytechnique féminine, Paris – Chimie de l'eau, traitement des eaux.

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

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

Mme Sophie LARDY-FONTAN – Directrice du laboratoire d'hydrologie de Nancy – Métrologie, chimie analytique, micropolluants, ultratrace, assurance qualité/contrôle qualité (QA/QC).

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

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

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

M. Damien MOULY – Epidémiologiste, responsable d'unité, en charge de surveillance des épidémies d'origine hydrique – Santé Publique France – Risques infectieux, risques

chimiques, PGSSE, épidémiologie, évaluation des risques sanitaires, expologie, surveillance, alerte.

Mme Fabienne PETIT – Professeur – Université de Rouen– Écologie microbienne.

Mme Catherine QUIBLIER – Professeure – Université Paris cité– Museum National d'Histoire Naturelle – Écologie des milieux aquatiques, Écologie et toxicité des cyanobactéries planctoniques et benthiques, surveillance.

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

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

Mme Michèle TREMBLAY – Docteur en médecine spécialiste en santé communautaire / Médecin conseil en santé au travail et en maladies infectieuses – retraitée – Santé travail, microbiologie de l'eau.

■ **CES « Évaluation des risques physico-chimiques dans les aliments » (CES ERCA 2022-2026)**

Président

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

Vice-présidente

Mme Marie-Louise SCIPPO - Professeur des universités - Compétences en chimie analytique et évaluation des risques.

Membres

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

M. Pierre-Marie BADOT - Professeur des universités - Compétences en transfert des contaminants.

Mme Marie-Yasmine BOTTEIN - Chercheur en toxicologie environnementale - Compétences en biotoxines marines.

Mme Rachida CHEKRI – Responsable de laboratoire - Compétences en chimie analytique.

M. Nicolas DELCOURT – Maître de conférences des universités, pharmacien hospitalier - Compétence en toxicologie clinique.

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

Mme Virginie DESVIGNES – Ingénieure Recherche – Compétences en évaluation des expositions et des risques.

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

M. Gautier EPPE – Professeur des universités – Compétences en chimie analytique.

Mme Anne-Sophie FICHEUX – Ingénieur de recherche – Compétences en toxicologie.

M. Eric HOUDEAU – Directeur de recherche – Compétences en toxicologie.

M. Jean-Philippe JAEG – Maître de conférence – Compétences en toxicologie et alimentation animale.

Mme Emilie LANCE - Maître de conférences des universités - Compétences en écotoxicologie et toxines.

M. Olivier LAPREVOTE – Professeur des universités et Praticien Hospitalier – Compétences en toxicologie.

M. Michel LAURENTIE – Directeur de recherche – Compétences en pharmacocinétique.

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

M. Jean-Charles LEBLANC – Chef d'unité- Compétences en évaluation des expositions et des risques.

M. Nicolas LOISEAU – Chargé de recherche - Compétences en biochimie.

M. David MAKOWSKI – Directeur de recherche - Compétences en statistiques, modélisation.

Mme Francesca MANCINI – Chargée de recherche - Compétences en épidémiologie.

M. Eric MARCHIONI – Professeur des universités - Compétences en chimie analytique.

M. Jean-François MASFARAUD - Maître de conférences des universités - Compétences en transfert des contaminants.

Mme Mathilde MUNIER – Chercheur hospitalier – Compétences en toxicologie.

Mme Isabelle OSWALD – Directrice de recherche – Compétences en toxicologie.

Mme Anne PLATEL – Maître de conférences des universités - Compétences en toxicologie.

M. Yann SIVRY – Maître de conférences des universités - Compétences en transfert des contaminants.

Mme Paule VASSEUR – Professeur émérite - Compétences en toxicologie.

RELECTEURS pour le CES ERCA

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

Mme Emilie LANCE – Maître de conférences des universités - Compétences en écotoxicologie et toxines.

Mme Paule VASSEUR – Professeur émérite - Compétences en toxicologie.

PARTICIPATION ANSES

Coordination et contribution scientifique

Mme Carole CATASTINI – coordinatrice d'expertise scientifique (pilote) – Unité d'Évaluation des risques liés à l'eau, Direction de l'évaluation des risques.

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

Mme Estelle CHECLAIR-WESTERBERG -- coordinatrice d'expertise scientifique – Unité d'Évaluation des risques liés à l'eau, Direction de l'évaluation des risques.

Mme Eléonore NEY – cheffe de l'unité d'Évaluation des risques liés à l'eau, Direction de l'Évaluation des risques.

Secrétariat administratif

Mme Françoise LOURENCO – Service d'Appui à l'expertise – Direction de l'Évaluation des Risques.

AUDITION DE PERSONNALITÉS EXTÉRIEURES

GIS Littoral basque

Mme Aurélie BOCQUET-ESCOURROU – Coordinatrice scientifique du GIS Littoral basque

ARS Nouvelle Aquitaine

M. Thomas MARGUERON – Responsable du pôle santé publique et santé environnementale

IFREMER

Mme Elvire ANTAJAN, Laboratoire Environnement Ressources d'Arcachon

Centre antipoison et de toxicovigilance de Nouvelle-Aquitaine

Mme Magalie LABADIE – Médecin- chef de service

M. Camille PARADIS – Pharmacien

GAST

Mme FERNET – Médecin inspecteur du travail en Nouvelle Aquitaine

Mme COQUET – Coordinatrice du GAST

SOMMAIRE

| | |
|---|-----------|
| Présentation des intervenants | 3 |
| Liste des tableaux | 15 |
| Liste des figures..... | 16 |
| 1 Contexte, objet et modalités de réalisation de l'expertise..... | 19 |
| 1.1 Contexte | 19 |
| 1.2 Objet de la saisine | 20 |
| 1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation..... | 22 |
| 1.4 Prévention des risques de conflits d'intérêts | 23 |
| 1.5 Méthode d'expertise | 23 |
| 1.6 Revue bibliographique | 23 |
| 1.6.1 Bibliographie générale | 23 |
| 1.6.2 Bibliographie relative au chapitre sur la contamination des produits de la mer..... | 24 |
| 2 Impacts sanitaires des proliférations d'<i>Ostreopsis</i> et des toxines associées .27 | 27 |
| 2.1 Historique des intoxications humaines | 27 |
| 2.2 Proliférations d' <i>Ostreopsis</i> sur les côtes Méditerranéennes..... | 28 |
| 2.2.1 Données colligées en Italie | 29 |
| 2.2.2 Données colligées dans d'autres pays du pourtour méditerranéen | 30 |
| 2.3 Proliférations d' <i>Ostreopsis</i> sur la côte atlantique | 31 |
| 2.3.1 Données colligées au Sénégal..... | 31 |
| 2.3.2 <i>Ostreopsis</i> au Pays Basque français en 2021, données médicales | 31 |
| 2.4 Tableau clinique des cas | 32 |
| 2.5 Aquarium récifaux et exposition à la palytoxine | 34 |
| 2.6 Diagnostics différentiels | 35 |
| 2.6.1 La dysgueusie avec goût métallique | 35 |
| 2.6.2 Les épistaxis isolées..... | 36 |
| 2.6.3 La maladie de Haff..... | 36 |
| 2.7 Points à retenir | 38 |
| 3 Diversité et biogéographie des espèces du genre <i>Ostreopsis</i>..... | 40 |
| 3.1 Description des espèces du genre <i>Ostreopsis</i> | 41 |
| 3.2 Phylogénie des espèces du genre <i>Ostreopsis</i> | 44 |
| 3.3 Biogéographie | 50 |
| 3.3.1 Distribution mondiale | 50 |
| 3.3.2 Distribution en France d'outre-mer..... | 52 |
| 3.3.3 Distribution en Méditerranée et sur la côte atlantique européenne..... | 55 |
| 3.4 Points à retenir | 58 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4 | Biologie et écologie des espèces du genre <i>Ostreopsis</i> | 60 |
| 4.1 | Développement des espèces du genre <i>Ostreopsis</i> dans les différents compartiments (benthique, planctonique et surface de l'eau)..... | 60 |
| 4.1.1 | Modes de reproduction d' <i>Ostreopsis</i> spp. | 64 |
| 4.2 | Impacts des facteurs biotiques et abiotiques sur la croissance cellulaire des espèces du genre <i>Ostreopsis</i> | 67 |
| 4.2.1 | Influence des facteurs abiotiques sur la croissance cellulaire | 67 |
| 4.2.2 | Influence des facteurs biotiques sur le développement d' <i>Ostreopsis</i> spp..... | 70 |
| 4.3 | Points à retenir | 72 |
| 5 | Toxines produites par les espèces du genre <i>Ostreopsis</i> | 73 |
| 5.1 | Description et structure chimique de la palytoxine | 74 |
| 5.2 | Toxines du groupe de la PLTX produites par <i>Ostreopsis</i> spp..... | 76 |
| 5.2.1 | Ovatoxines et isob-PLTX | 82 |
| 5.2.2 | Ostréocines | 83 |
| 5.2.3 | Mascarénotoxines (McTX) | 84 |
| 5.3 | Autres toxines produites par <i>Ostreopsis</i> spp..... | 84 |
| 5.3.1 | Ostréols | 84 |
| 5.3.2 | Ostréotoxines | 85 |
| 5.3.3 | Liguriatoxines et riviératoxines..... | 85 |
| 5.4 | Toxines produites les espèces d' <i>Ostreopsis</i> présentes sur la côte basque..... | 85 |
| 5.5 | Points à retenir | 86 |
| 6 | Toxicité | 87 |
| 6.1 | Toxicité de la palytoxine (PLTX) | 87 |
| 6.1.1 | Cinétique | 87 |
| 6.1.2 | <i>In vivo</i> | 87 |
| 6.1.3 | <i>In vitro</i> / <i>ex vivo</i> | 101 |
| 6.1.4 | Mécanisme d'action | 104 |
| 6.1.5 | Conclusion..... | 106 |
| 6.2 | Toxicité de la 42-OH-PLTX | 107 |
| 6.2.1 | Cinétique | 107 |
| 6.2.2 | <i>In vivo</i> | 108 |
| 6.2.3 | <i>In vitro</i> | 109 |
| 6.2.4 | Mécanisme d'action | 110 |
| 6.3 | Toxicité des ovatoxines..... | 110 |
| 6.3.1 | Cinétique | 110 |
| 6.3.2 | <i>In vivo</i> | 110 |
| 6.3.3 | <i>In vitro</i> | 113 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 6.3.4 | Mécanisme d'action | 114 |
| 6.4 | Toxicité d'autres analogues de la PLTX..... | 114 |
| 6.4.1 | Toxicité de l'ostréocine-D..... | 114 |
| 6.4.2 | Toxicité des mascalénotoxines..... | 116 |
| 6.5 | Toxicité des autres « toxines » produites par <i>Ostreopsis</i> | 117 |
| 6.5.1 | Toxicité des ostréols | 117 |
| 6.5.2 | Toxicité des ostréotoxines | 118 |
| 6.5.3 | Toxicité des liguriatoxines et des riviératoxines | 119 |
| 6.6 | Valeur toxicologique de référence..... | 119 |
| 6.7 | Points à retenir | 120 |
| 7 | Contamination du milieu par <i>Ostreopsis</i> et ses toxines..... | 121 |
| 7.1 | Eau..... | 121 |
| 7.1.1 | Abondances des espèces du genre <i>Ostreopsis</i> | 121 |
| 7.1.2 | Toxines..... | 126 |
| 7.2 | Aérosols | 128 |
| 7.3 | Produits de la mer..... | 129 |
| 7.3.1 | Mollusques bivalves..... | 130 |
| 7.3.2 | Crustacés | 135 |
| 7.3.3 | Céphalopodes | 137 |
| 7.3.4 | Echinodermes..... | 138 |
| 7.3.5 | Poissons..... | 141 |
| 7.3.6 | Gastéropodes | 146 |
| 7.4 | Points à retenir | 147 |
| 8 | Proposition de valeur guide en toxines d'<i>Ostreopsis</i> dans les produits de la mer | 149 |
| 8.1 | Points à retenir | 150 |
| 9 | Stratégies d'échantillonnage, techniques de prélèvements et de quantification d'<i>Ostreopsis</i> et des toxines associées | 151 |
| 9.1 | Stratégie d'échantillonnage..... | 151 |
| 9.2 | Méthodes de prélèvements et d'analyses des échantillons..... | 155 |
| 9.2.1 | Prélèvement, transport et conservation des échantillons planctoniques et des fleurs d'eau..... | 155 |
| 9.2.2 | Prélèvement, transport et conservation des échantillons benthiques | 156 |
| 9.2.3 | Prélèvements des aérosols..... | 160 |
| 9.2.4 | Prélèvements des organismes marins | 162 |
| 9.3 | Méthodes pour l'identification et le dénombrement des <i>Ostreopsis</i> | 162 |
| 9.3.1 | Préparation des échantillons avant comptage et observation | 162 |

| | | |
|---|--|------------|
| 9.3.2 | Comptages cellulaires | 163 |
| 9.4 | Approches de biologie moléculaire | 164 |
| 9.4.1 | PCR- quantitative..... | 164 |
| 9.5 | Analyse des toxines..... | 165 |
| 9.5.1 | Traitement des échantillons | 165 |
| 9.5.2 | Méthodes d'analyse des toxines | 167 |
| 9.5.3 | Bilan des méthodes analytiques | 173 |
| 9.6 | Points à retenir | 174 |
| 10 | Réglementations et recommandations en France et à l'international pour la surveillance d'<i>Ostreopsis</i> et des toxines associées..... | 175 |
| 10.1 | Surveillance d' <i>Ostreopsis</i> dans les eaux de baignade | 175 |
| 10.1.1 | En France..... | 175 |
| 10.1.2 | Sur le pourtour méditerranéen de l'union européenne | 178 |
| 10.1.3 | Autres pays européens..... | 183 |
| 10.2 | Surveillance des toxines d' <i>Ostreopsis</i> dans les produits de la mer | 183 |
| 10.3 | Points à retenir : | 185 |
| 11 | Conclusions du groupe de travail | 186 |
| 11.1 | Recommandations pour la surveillance d' <i>Ostreopsis</i> et de ses toxines, ainsi que pour la prévention des dangers liés à ses proliférations..... | 187 |
| 11.1.1 | Surveillance d' <i>Ostreopsis</i> dans l'eau sur le littoral basque..... | 187 |
| 11.1.2 | Surveillance des <i>Ostreopsis</i> dans les aérosols..... | 191 |
| 11.1.3 | Surveillance des produits de la mer | 191 |
| 11.1.4 | Proposition de valeur guide en toxines produites par <i>Ostreopsis</i> | 191 |
| 11.1.5 | Recommandations pour la détection et quantification des toxines | 192 |
| 11.1.6 | Recommandations pour limiter l'exposition des professionnels et des riverains sur la côte basque..... | 193 |
| 11.2 | Outil d'aide à la décision pour la gestion des proliférations d' <i>Ostreopsis</i> sur la côte basque..... | 194 |
| 11.3 | Besoins de recherche | 198 |
| 12 | Bibliographie..... | 204 |
| 12.1 | Publications | 204 |
| Annexe 1 : Lettre de saisine | | 234 |
| Annexe 2 : Résultats des lésions observées après inhalation d'aérosols de PLTX, de 42-OH- PLTX ou d'OVTX chez le rat | | 238 |
| Annexe 3 : Tableau synoptique des méthodes et stratégies de prélèvements d'aérosols pour les analyses de toxines, <i>in situ</i> ou en milieu contrôlé | | 241 |

Sigles et abréviations

| | |
|------------------|--|
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| AFM | Microscopie à force atomique |
| AINS | Anti-inflammatoires non stéroïdiens |
| ALT | Alanine-aminotransférase |
| APC | Apical Pore Complex - Complexe du pore apical |
| ARS | Agence régionale de santé |
| AST | Aspartate-aminotransférase |
| ATP | Adénosine-Triphosphate |
| BES | Bioessai sur souris |
| BPCO | Bronchopneumopathie chronique obstructive |
| BuOH | n-Butanol |
| CAPTIV | Centre antipoison et de toxicovigilance |
| CE | Electrophorèse capillaire |
| cell/gPF | Nombre de cellules de microalgue par gramme de poids frais de macrophyte |
| CE ₅₀ | Concentration efficace médiane |
| CES | Comité d'experts spécialisé |
| CPK | Créatine phosphokinase |
| DAD | Détecteur à barrettes diode |
| DEE | Ether diéthylique |
| DGAL | Direction générale de l'alimentation |
| DGS | Direction générale de la santé |
| DMSO | Diméthylsulfoxyde |
| ELISA | Enzyme-linked-immunosorbent assay |
| EMERGTOX | Réseau de veille d'urgence des biotoxines marines dans les coquillages |
| ERCA | Evaluation des risques physico-chimiques dans les aliments |
| fg | Fentogramme |
| FLD | Détection par fluorescence |
| GIS | Groupe d'intérêt scientifique |
| GT | Groupe de travail |
| Ifremer | Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer |
| ITS | Internal transcribed spacer (espaceur interne transcrit) |
| LC ₅₀ | Concentration létale à 50% |
| LC-MS | Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse |

| | |
|----------|--|
| LC-MS/MS | Chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse en tandem |
| LC-HRMS | Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution |
| LC-UV | Chromatographie liquide couplée à une détection par spectroscopie UV |
| LD | Limite de détection |
| LDH | Lactate Déshydrogénase |
| LGTX | Liguriatoxines |
| LLE | Extraction liquide-liquide |
| LQ | Limite de quantification |
| LSU | Large subunit (large sous-unité de l'ADN ribosomal) |
| MCTX | Mascarenotoxines |
| MeOH | Méthanol |
| OTX | Ostréotoxines |
| OVTX | Ovatoxines |
| ORL | Oto-rhino-laryngologie |
| OST | Ostréocines |
| PACA | Provence-Alpes-Côte d'Azur |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| PF | Poids frais |
| PLTX | Palytoxine |
| PSS2 | Poisoning severity score |
| PSU | Practical salinity unit |
| REPHY | Réseau d'observation et de surveillance du phytoplancton et de l'hydrologie dans les eaux littorales |
| RMN | Résonance magnétique nucléaire |
| RVTX | Rivieratoxines |
| SM | Spectrométrie de masse |
| SPE | Extraction en phase solide |
| SPR | Résonance plasmonique de surface |
| SSU | Small subunit (petite sous-unité de l'ADN ribosomal) |
| TTX | Tétrodotoxine |
| US | Unité souris |
| VSR | Valeur sanitaire de référence |
| VTR | Valeur toxicologique de référence |

Liste des tableaux

| | |
|---|-----|
| Tableau I : Cadrage de la recherche des articles..... | 25 |
| Tableau II : Sélection des articles..... | 25 |
| Tableau III : Tableau clinique des expositions, à <i>Ostreopsis</i> ou aux toxines du groupe de la PLTX, produites par le corail mou. | 33 |
| Tableau IV : Toxines produites par <i>Ostreopsis</i> spp ainsi que les zones géographiques où elles ont été détectées..... | 73 |
| Tableau V : Toxines du groupe de la PLTX (PLTX, ovatoxines, ostréocines et mascarénotoxines) retrouvés chez <i>Palythoa toxica</i> et chez différentes espèces d' <i>Ostreopsis</i> : formule brute, masse molaire (théorique) et positions suspectées des modifications chimiques (annotées R1 à R10 sur la Figure 27). Seule la structure de l'ovatoxine-a et l'Ostreocine-D sont élucidée par RMN à partir de toxines pures. Pour les autres analogues, il s'agit d'hypothèses de structures à partir de formules brutes. | 78 |
| Tableau VI : Abondance relative des ovatoxines (OVTX) et de la palytoxine isobare (isob-PLTX) dans les profils toxiques des souches d' <i>O. cf. ovata</i> prélevées en Méditerranée | 83 |
| Tableau VII : toxicité in vivo (DL50) des toxines du groupe de la PLTX | 88 |
| Tableau VIII : Concentrations en toxines du groupe de la PLTX dans les mollusques..... | 132 |
| Tableau IX : Concentrations en toxines du groupe de la PLTX dans les crustacés..... | 136 |
| Tableau X : Concentrations en toxines du groupe de la PLTX dans les céphalopodes..... | 137 |
| Tableau XI : Concentrations en toxines du groupe de la PLTX dans les échinodermes | 139 |
| Tableau XII : Concentrations en toxines du groupe de la PLTX dans les poissons..... | 143 |
| Tableau XIII : Concentrations en toxines du groupe de la PLTX dans des holothuries et des gastéropodes | 146 |
| Tableau XIV : Couples d'amorces créées par Penna et al. (2007) pour la détecton d' <i>Ostreopsis</i> spp., d' <i>O. cf. siamensis</i> et d' <i>O. cf. ovata</i> | 165 |
| Tableau XV : Limites de détermination de différentes techniques d'analyse de la PLTX | 173 |
| Tableau XVI : stratégie de surveillance mise en place sur la côte basque en 2022 | 178 |
| Tableau XVII : Lignes directrices pour la protection de la santé humaine dans les eaux de baignade affectées par les proliférations d' <i>O. cf. ovata</i> | 179 |
| Tableau XVIII : Résultats des lésions observées après inhalation d'aérosols de PLTX chez le rat ; N= pas d'effet observé, O= effet observé (d'après Poli et al., 2018). | 238 |
| Tableau XIX: Résultats des lésions observées après inhalation d'aérosols de 42-OH- PLTX chez le rat ; N= pas d'effet observé, O= effet observé (d'après Poli et al., 2018)..... | 239 |
| Tableau XX : Résultats des lésions observées après inhalation à des aérosols d'OVTX purifiées chez le rat ; N= pas d'effet observé, O= effet observé (d'après Poli et al. 2018).... | 240 |
| Tableau XXI : Tableau synoptique des méthodes et stratégies de prélèvements d'aérosols marins (et lacustres) pour les analyses de toxines, in situ, lors d'épisodes de prolifération | 241 |
| Tableau XXII : Tableau synoptique des méthodes de prélèvements d'aérosols en milieu contrôlé (laboratoire) | 242 |

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Diagramme PRISMA de sélection d'articles..... | 24 |
| Figure 2 : Morphologie des dinoflagellés - Face ventrale (gauche) - Face dorsale (droite) ... | 40 |
| Figure 3 : Illustration originale d' <i>Ostreopsis siamensis</i> décrite par Schmidt 1901 dans le Golfe de Siam (épithèque à gauche, hypothèque au milieu, vue latérale à droite) | 41 |
| Figure 4 : Représentation des espèces du genre <i>Ostreopsis</i> décrites avant 2014, avec la limite des plaques sur des thèques..... | 42 |
| Figure 5 : Représentation d' <i>Ostreopsis rhodesiae</i> et d' <i>Ostreopsis heptagona</i> , avec les limites et la numérotation des plaques (tabulation). A : Epithèque, B : Hypothèque | 43 |
| Figure 6 : Représentation d' <i>Ostreopsis fattorussoi</i> avec les limites et la numérotation des plaques (tabulation). (A) épithèque, (B) hypothèque et cingulum. Sda, plaque sulcale antérieure droite ; Ssa, plaque sulcale antérieure gauche ; Sp, plaque sulcale supérieure | 43 |
| Figure 7 : Arbre phylogénétique à vraisemblance maximale construit à partir des séquences D1–D3 de l'ADNr LSU de diverses espèces d' <i>Ostreopsis</i> . D'après Chomérat <i>et al.</i> (2020b) | 45 |
| Figure 8 : Arbre phylogénétique à vraisemblance maximale construit à partir des séquences d'ADNr LSU D8 – D10 de diverses espèces d' <i>Ostreopsis</i> | 46 |
| Figure 9 : Arbre phylogénétique à vraisemblance maximale construit à partir des séquences d'ADNr ITS-5.8S de diverses espèces d' <i>Ostreopsis</i> . <i>Ostreopsis mascarenensis</i> et <i>Ostreopsis</i> sp. 4 sont utilisées comme groupes externes | 47 |
| Figure 10 : Arbre phylogénétique basé sur 189 séquences concaténées d'opéron ribosomique (SSU + ITS + LSU D1-D3 et D8-D10) (6 382 paires de bases alignées) de différentes souches d' <i>Ostreopsidoideae</i> et d'autres <i>Gonyaulacales</i> en tant que groupes externes | 48 |
| Figure 11 : Arbre phylogénétique des espèces d' <i>Ostreopsis</i> , basé sur les ITS et le 5.8S..... | 50 |
| Figure 12 : Répartition mondiale des différentes espèces d' <i>Ostreopsis</i> | 51 |
| Figure 13 : Répartition connue des genres de dinoflagellés benthiques des eaux tropicales et subtropicales d'Amérique latine, ainsi que de la mer des Caraïbes et des côtes adjacentes des Amériques | 52 |
| Figure 14 : Abondance des espèces de cinq genres de dinoflagellés benthiques en Guadeloupe (en haut) et en Martinique (en bas) | 53 |
| Figure 15 : Abondance des espèces de cinq genres de dinoflagellés benthiques à Saint Martin, partie française (au Nord) et partie néerlandaise (au Sud) | 54 |
| Figure 16 : Carte de distribution des espèces du genre <i>Ostreopsis</i> en Méditerranée, en différenciant les morphotypes (identification par la morphologie) et les génotypes (identification moléculaire)..... | 55 |
| Figure 17 : Carte de la zone étudiée lors d'une mission réalisée en 2018 par Drouet et collaborateurs. Les points représentent les sites de prélèvement..... | 57 |
| Figure 18 : Abondance d' <i>O. cf. siamensis</i> benthique estimée par comptage au microscope optique (en nombre de cellules par gramme de poids frais de macroalgues sur lesquelles elles ont été prélevées) et température et salinité de l'eau de mer sur les sites de prélèvement figurant dans la Figure 17..... | 57 |
| Figure 19 : Distribution d' <i>O. cf. siamensis</i> estimée par trois approches : A : comptage au microscope d' <i>O. cf. siamensis</i> benthique (en nombre de cellules par gramme de poids frais de macroalgues sur lesquelles elles ont été prélevées) ; B : analyses par qPCR ; C : détection de l'eDNA..... | 58 |

| | |
|---|-----|
| Figure 20 : Photos illustrant le développement d' <i>O. cf. ovata</i> sur des macroalgues (à gauche) et des galets (à droite) à Rochambeau (Villefranche-sur-Mer, France)..... | 60 |
| Figure 21 : Photos du mucilage produit par <i>O. cf. ovata</i> en microscopie optique (a, c) et électronique à balayage (b, d-f)..... | 61 |
| Figure 22 : Fleurs d'eau d' <i>O. cf. ovata</i> | 62 |
| Figure 23 : représentation schématique des deux phases, benthique et planctonique, du développement d' <i>Ostreopsis</i> | 63 |
| Figure 24 : Schéma représentant le cycle de vie le plus communément observé chez les dinoflagellés, avec les reproductions sexuées, asexuées et l'enkystement | 65 |
| Figure 25 : Cycle de vie asexué (A-L) et sexué (M-X) d' <i>O. cf. ovata</i> provenant de cultures ou d'échantillons prélevés in situ..... | 66 |
| Figure 26 : Cellules d' <i>O. cf. ovata</i> infectées par le parasite <i>Parvilucifera sinerae</i> | 71 |
| Figure 27 : Structure de la palytoxine et de ses analogues dont la structure chimique est connue | 75 |
| Figure 28 : Structure de la palytoxine avec ses sites d'absorbance à 233 et 263 nm (en bleu), le fragment A (en marron) et la position des modifications chimiques par rapport à ses analogues (en rouge) retrouvés chez <i>Ostreopsis</i> spp | 77 |
| Figure 29 : (A) Structure chimique de l'ostréol-A ; (B) de l'ostréol-B | 85 |
| Figure 30 : Schéma du fonctionnement de la pompe Na/K-ATPase | 105 |
| Figure 31 : Abondances (cellules L ⁻¹) maximales d' <i>Ostreopsis</i> observées aux divers sites suivis dans le cadre du contrôle sanitaire des eaux de baignade ARS entre 2018 et 2021 | 123 |
| Figure 32 : Évolution de l'abondance d' <i>Ostreopsis</i> (carrés blancs, gris et noirs) dans la colonne d'eau (en cellules/L) et des températures de l'eau (courbe bleue) aux quatre points surveillés en 2022 par l'Ifremer sur la côte basque..... | 125 |
| Figure 33 : Variations des abondances cellulaires d' <i>Ostreopsis</i> (mélange de deux espèces, <i>O. cf. ovata</i> et <i>O. cf. siamensis</i>) pendant sa phase benthique (losanges noirs, concentrations exprimées en nombre de cellules par gramme de poids frais de la macroalgue (cell.g PF ⁻¹) sur laquelle était réalisé le prélèvement) et pendant sa phase planctonique (carrés noirs, concentrations exprimées en nombres de cellules/L d'eau ; ces valeurs sont déjà présentées dans la figure 32) sur les quatre sites suivis par l'Ifremer en 2022. | 126 |
| Figure 34 : Prélèvement de macroalgues en Méditerranée, à 50 cm de profondeur. Il est important d'ouvrir et de fermer le flacon à la profondeur de prélèvement. Ce prélèvement a été réalisé hors période de prolifération d' <i>Ostreopsis</i> ce qui explique l'absence de port de gants. Photo Lab. d'Océanographie de Villefranche | 156 |
| Figure 35 : représentation schématique de l'utilisation du BEDI sans port d'équipement de protection individuel (EPI) | 158 |
| Figure 36 : Mise en place de substrats artificiels. | 159 |
| Figure 37 : Méthode des substrats artificiels pour le prélèvement spécifique d' <i>Ostreopsis</i> , en zones tempérées, développé par Jauzein <i>et al.</i> (2016), | 159 |
| Figure 38 : algorithme décisionnel établi par la Direction Générale de la Santé (DGS) pour la surveillance des eaux de baignade (DGS, 2009 et 2010)..... | 177 |
| Figure 39 : Carte des stations incluses au plan de surveillance d' <i>Ostreopsis</i> en Catalogne après 2019. B Prolifération d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> à Sant Andreu de Llavaneres, juillet 2014. Source des données : Agence Catalane de l'Eau, Generalitat de Catalunya et Institut de Ciències del Mar-CSIC..... | 182 |

- Figure 40 : Carte des douze sites d'échantillonnage de coquillages en France dans le cadre d'EMERGTOX désignés par des triangles rouges. L'espèce de coquillages respectifs étudiée dans ces localités est indiquée par un symbole explicite dans la légende (Amzil *et al.*, 2021).....185
- Figure 41: Arbre décisionnel pour la surveillance et le contrôle sanitaire des sites de baignade et des sites d'activités de loisirs nautiques touchés par des proliférations d'*Ostreopsis*.....197

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

1.1 Contexte

Au cours des dernières décennies, les dinoflagellés du genre *Ostreopsis* ont été identifiés dans les eaux marines de plusieurs pays européens tels que l'Albanie, la Croatie, Chypre, l'Espagne, la France, la Grèce, l'Italie, Monaco et le Portugal (Accoroni et Totti, 2016; Aligizaki *et al.*, 2008 ; Amzil *et al.*, 2012 ; Ciminiello *et al.*, 2006 ; Del Favero *et al.*, 2012a ; Fraga *et al.*, 2017 ; Funari, Manganeli et Testai, 2015 ; Santos *et al.*, 2019). Ces microalgues sont principalement benthiques et vivent de préférence sur des substrats biotiques, comme des macrophytes (macroalgues et phanérogames marines). Elles peuvent néanmoins se retrouver en suspension dans l'eau (elles sont alors planctoniques) ou même former des agrégats en surface, on les nomme alors fleurs d'eau. Ces microalgues peuvent causer des intoxications humaines lorsque les cellules ou les toxines qu'elles produisent sont présentes dans l'eau de mer, dans les embruns et aérosols ou dans certains produits de la mer (Patocka *et al.*, 2018 ; Pelin *et al.*, 2016a ; Walsh, 2017). L'exposition peut se faire :

- par voie respiratoire (inhalation et/ou contact avec les aérosols lors de promenade, de surveillance des plages, des activités de baignade et nautiques, *etc.*) ;
- par contact cutané avec de l'eau de mer ou des macrophytes, support d'*Ostreopsis* (lors des activités de baignade et/ou nautiques) ;
- par ingestion d'eau de mer lors de la baignade ou de pratiques d'activités nautiques ou encore en cas de consommation de produits de la mer contaminés par des toxines produites par *Ostreopsis* spp.

Des manifestations cliniques telles que toux, rhinorrhée, irritations de la sphère ORL et des yeux, céphalées, fièvre, difficultés respiratoires, nausées, vomissements, diarrhées, douleurs abdominales, myalgies, rougeurs ou démangeaisons sont alors observées chez les personnes exposées à *Ostreopsis* (Berdalet *et al.*, 2022).

En France, la présence d'*Ostreopsis* est identifiée de façon récurrente sur les côtes méditerranéennes depuis une quinzaine d'années (Mangialajo, 2011 ; Gémis *et al.*, 2020a). Plus récemment, 674 personnes ont développé des signes et des symptômes associés aux proliférations d'*Ostreopsis* sur la côte basque française durant l'été 2021 (Paradis et Labadie, 2022). Le bilan épidémiologique de ces intoxications montre qu'il n'existe pas de différence clinique avec les effets observés lors des épisodes de prolifération d'*Ostreopsis* cf. *ovata* du pourtour méditerranéen.

Les investigations menées par l'Ifremer ont mis en évidence sur la côte basque la présence de deux espèces de microalgues du genre *Ostreopsis* pendant les épisodes de proliférations de 2021 et 2022 : *O.* cf. *siamensis* et *O.* cf. *ovata* (Amzil *et al.*, 2021, Chomérat *et al.*, 2022). Si la première, *O.* cf. *siamensis*, est présente sur cette côte depuis 2018, la seconde, *O.* cf. *ovata*, a été identifiée dans cette partie du golfe de Gascogne pour la première fois en 2021.

Ostreopsis cf. *ovata* est connue pour produire des toxines dont la structure est proche de celle de la palytoxine (PLTX) (Amzil *et al.*, 2012 ; Brissard *et al.*, 2015 ; Ciminiello *et al.*, 2008 ; Ciminiello *et al.*, 2012a ; Ciminiello *et al.*, 2010 ; García-Altare *et al.*, 2015 ; Gémis *et al.*, 2020a ; Tartaglione *et al.*, 2017). Ces molécules pourraient être à l'origine des symptômes observés dans les populations humaines (Illoul *et al.*, 2012 ; Tichadou *et al.*, 2010), d'autant

plus que certaines d'entre elles ont été détectées dans les aérosols en Méditerranée (Ciminiello *et al.*, 2014 ; Medina-Pérez *et al.*, 2021).

1.2 Objet de la saisine

La Direction générale de la santé (DGS) et la Direction générale de l'alimentation (DGAL) ont saisi l'Anses le 3 décembre 2021 d'une « demande d'avis relatif aux risques liés aux proliférations d'*Ostreopsis* spp. sur l'ensemble du littoral français ». L'Agence a redéfini le périmètre et modifié le titre de la saisine afin de se focaliser sur les risques liés à la présence d'*Ostreopsis* sur la côte basque.

L'objectif de cette saisine est, d'une part, la mise à jour des connaissances relatives aux microalgues du genre *Ostreopsis* pour lesquelles l'Agence avait déjà rendu deux avis en 2007 et 2008 (Afssa, 2007 ; 2008) et, d'autre part, l'établissement de recommandations spécifiques à la côte atlantique. Si cela s'avère opportun, l'Agence devra également mettre à jour les recommandations spécifiques à la côte méditerranéenne établies en 2007-2008. Cette saisine porte sur les risques sanitaires liés aux diverses voies d'exposition : par inhalation (exposition aux aérosols), par ingestion (consommation de produits de la mer contaminés ou d'eau lors de la pratique d'activités aquatiques) ou suite à un contact cutané ou oculaire, tout en prenant en considération les particularités liées à la protection des travailleurs concernés.

Les questions qui figurent dans le courrier initial de saisine sont les suivantes :

- « *Quelles sont les nouvelles données scientifiques publiées depuis les précédents avis, relatives à la fois aux microalgues du genre *Ostreopsis*, et aux toxines qu'elles produisent? Quels sont les niveaux de toxicité connus pour les différentes toxines produites? Quelles sont les conditions favorables pour que les microalgues du genre *Ostreopsis* libèrent des toxines? L'intoxication humaine est-elle liée à une exposition directe aux toxines, ou survient-elle lors de l'exposition aux microalgues qui produisent ensuite les toxines? Quels sont les risques pour les différents usagers de la mer selon les différentes voies d'exposition (alimentaire, activités aquatiques, embruns) ?*
- *Quelles sont les conditions environnementales favorables au développement des différentes espèces du genre *Ostreopsis*? Quelle est la répartition et la dynamique des populations d'*Ostreopsis* sur les côtes françaises? Est-il envisageable à court ou moyen terme d'établir une cartographie du risque d'efflorescence d'*Ostreopsis* spp. sur les côtes métropolitaines? Un plan exploratoire est-il nécessaire pour établir cette cartographie? Si oui, quelles devraient en être les lignes directrices?*
- *Sur la base de l'expérience acquise en Méditerranée, quelles sont les préconisations en matière de méthodologie de prélèvement et d'analyse pour surveiller l'apparition d'*Ostreopsis* sur la côte atlantique? Dans quelles conditions la recherche du genre « *Ostreopsis* spp. » doit-elle être intégrée au contrôle sanitaire des eaux de baignade?*
- *Quel est le seuil de concentration d'*Ostreopsis* dans l'eau / de toxines dans l'air ou les aliments devant déclencher une alerte sur la côte atlantique? Quelles sont les recommandations en matière de mesures de gestion en cas de dépassement de ces seuils? Existe-t-il des espèces indicatrices, plus aisément identifiables en routine, susceptibles d'alerter sur la présence de microalgues du genre *Ostreopsis* ?*
- *Existe-t-il dans d'autres pays des méthodes de détection rapides qui pourraient être mises en œuvre pour identifier la toxine en cause lors d'une épidémie ?*

- *En matière de sécurité des travailleurs, quelles sont les recommandations spécifiques pour éviter une exposition chronique lors des efflorescences ? »*

Dans le cadre du contrat d'expertise établi le 20 décembre 2021, l'Agence a redéfini le périmètre de la saisine, reformulé les questions et modifié le titre de cette dernière afin de se focaliser sur les risques liés à la présence d'*Ostreopsis* sur la côte basque.

Ainsi, l'expertise a été réalisée selon deux axes, un premier concernant le bilan des connaissances et un second relatif à l'élaboration de recommandations, détaillés comme suit :

■ État des connaissances

- description des espèces du genre *Ostreopsis* ;
- identification et description des toxines associées ;
- écologie du genre *Ostreopsis* (conditions favorables aux proliférations d'*Ostreopsis* et conditions associées à la production de toxines) ;
- présence d'*Ostreopsis* sur les côtes françaises métropolitaines et, si possible, ultramarines (établissement d'une cartographie avec les données du REPHY et/ou les données issues de projets de recherche) ;
- météorologie du genre *Ostreopsis* et des toxines associées dans l'eau, l'air et les coquillages et sur les macroalgues (description des méthodes de prélèvement et d'analyse, y compris les méthodes de détection rapide) ;
- voies d'exposition - populations exposées aux cellules d'*Ostreopsis* et aux toxines associées et populations sensibles ;
- description de programmes de surveillance, de norme ou de réglementation relatifs à *Ostreopsis* à l'international, dans l'eau, l'air et les coquillages ;
- description du programme actuel de surveillance en Méditerranée ;
- données de toxicité selon les toxines identifiées et les voies d'exposition (éléments de réponse à la question : les intoxications humaines sont-elles liées aux toxines connues (palytoxines et dérivés) ou à d'autres molécules non identifiées à ce jour) ?
- exploitation des données épidémiologiques issues des centres antipoison (CAPTV) (épisode de l'été 2021 et épisodes précédents sur les côtes méditerranéennes).

■ Recommandations établies en fonction du bilan de l'état des connaissances :

- proposition de valeur toxicologique aiguë et subchronique pour les voies orale/respiratoire/cutanée pour la toxine de référence ;
- proposition d'un seuil de concentration d'*Ostreopsis* et/ou de toxines dans l'eau ou sur des macroalgues et/ou dans l'air et/ou dans les coquillages à ne pas dépasser ? Le seuil est-il différent en fonction des espèces du genre *Ostreopsis* ?
- proposition de mesures/investigations complémentaires en cas de dépassement du seuil ;
- recommandations pour la stratégie d'échantillonnage et de méthodes adaptées pour le prélèvement et l'analyse des cellules et/ou des toxines associées selon les matrices (eau, macroalgues, produits de la mer, embruns) ;

- recommandations pour la surveillance d'*Ostreopsis* sur la côte basque (points de prélèvements, type de support (eau, macroalgues, autres), fréquence, etc.). Est-il possible d'identifier des zones / périodes à risque sur la côte basque / atlantique ?
- éléments de réponse à la question : quels sont les risques pour les différents usagers de la mer selon les différentes voies d'exposition (alimentaire, activités aquatiques, embruns) ?
- préconisations spécifiques pour les professionnels et la ou les population(s) sensible(s) (asthmatiques, etc.).

Ce rapport présente les points suivants :

- les impacts sanitaires des proliférations d'*Ostreopsis* et des toxines associées ;
- la diversité et la biogéographie des espèces du genre *Ostreopsis* ;
- l'écologie des espèces du genre *Ostreopsis* ;
- la description des toxines produites par les espèces du genre *Ostreopsis* ;
- la toxicité des toxines produites par *Ostreopsis* ;
- la contamination des milieux par *Ostreopsis* et les toxines associées ;
- l'établissement d'une valeur guide dans les produits de la mer ;
- les stratégies d'échantillonnage, techniques de prélèvements et de quantification d'*Ostreopsis* et des toxines associées ;
- la réglementation en France et à l'international relative à la surveillance des *Ostreopsis* et ses toxines associées ;
- les conclusions et recommandations des experts du GT « *Ostreopsis* ».

1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

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 relève du domaine de compétence des comités d'experts spécialisés (CES) « Eaux », « Évaluation des risques physico-chimiques liés aux aliments » (ERCA) et « Valeurs sanitaires de références » (VSR). L'Anses a confié l'instruction de cette saisine au groupe de travail (GT) « *Ostreopsis* », créé après un appel public à candidatures, rattaché au comité d'experts spécialisé (CES) « Eaux ».

Les travaux d'expertise du GT « *Ostreopsis* » ont été soumis régulièrement au CES « Eaux », (tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques), les 10 mai, 7 juin et 6 décembre 2022 et les 7 mars, 4 avril 2023 et 6 juin 2023, ainsi qu'au CES « ERCA », les 11 janvier, 12 mai et 2 juin 2022 et les 13 janvier, 7 février et 14 mars 2023. Les sections relatives à l'eau et aux aérosols ont été adoptées par le CES « Eaux » le 6 juin 2023 et les sections relatives aux produits de la mer ont été adoptées par le CES ERCA le 14 mars 2023. Le présent rapport, rédigé par le GT « *Ostreopsis* », tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres des CES.

Le CES « VSR » s'est vu confier la construction de deux VTR pour la palytoxine pour une exposition aiguë et une exposition répétée par voie orale. Les travaux ont été présentés et

validés le 19 janvier 2023 pour la VTR aiguë et le 09 mars 2023 pour la VTi moyen terme. Ces travaux ont fait l'objet d'un avis publié sur le site de l'Agence le 23 juin 2023 (Anses, 2023).

1.4 Prévention des risques de conflits d'intérêts

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

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

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

1.5 Méthode d'expertise

Pour répondre aux questions de la saisine, le GT « *Ostreopsis* » s'est basé sur une revue approfondie de la littérature (de type « scoping review ») ainsi que sur les résultats du projet de recherche Ocean15¹ qui a investigué la toxicité *in vitro* de la palytoxine (PLTX) et des ovatoxines (OVTX) -a et -d sur divers types cellulaires. Des auditions ont également été conduites auprès des acteurs locaux et experts (scientifiques, gestionnaires, médecins).

1.6 Revue bibliographique

1.6.1 Bibliographie générale

Afin de mener une recherche bibliographique la plus exhaustive possible visant à identifier les articles pertinents pour répondre aux questions de la saisine, la revue approfondie de la littérature a été réalisée en interrogeant trois bases de données (Scopus, ScienceDirect et Pubmed) en utilisant le terme « *Ostreopsis* » dans le champ « Titre-Résumé-Mot clé » pour Scopus et Science Direct et dans « Tous les champs » pour Pubmed, sans limitation de temps. La recherche a été réalisée le 22 décembre 2021 et a permis d'identifier 470 références (une fois les doublons retirés). Une recherche des thèses françaises de doctorat de recherche soutenues en utilisant le terme « *Ostreopsis* » a été effectué sur le moteur de recherche <http://www.theses.fr/> : 41 thèses ont été recensées.

L'ensemble des références ont été exportées dans Endnote. Elles ont fait l'objet d'une première sélection qui a permis de retenir 392 références (**Figure 1**) selon les critères suivants

Critères d'inclusion :

- Etudes sur les *Ostreopsis* ;
- Métrologie des *Ostreopsis* ;
- Effets sanitaires des *Ostreopsis* ;

¹ <https://anr.fr/Projet-ANR-15-CE35-0002>

- Toxicité des *Ostreopsis* ;
- Données d'exposition.

Critères d'exclusion :

- Langue autre que français et anglais ;
- Articles non disponibles en entier.

Des recherches bibliographiques complémentaires ont été effectuées grâce à la base de données Scopus, entre janvier et mars 2022, pour compléter les données disponibles et intégrer dans la recherche initiale les publications relatives aux différentes toxines produites par *Ostreopsis*. 28 documents issus de cette recherche ont été intégrés au rapport final. La découverte d'une nouvelle espèce d'*Ostreopsis* dans les Îles Cook et Niué a conduit à l'ajout d'une nouvelle référence bibliographique en début d'année 2023. Deux autres documents (une thèse et un rapport Ifremer) publiés en 2023 ont également été ajouté au rapport.

Enfin, 89 références ont été ajoutées par les experts à la suite de ces recherches bibliographiques.

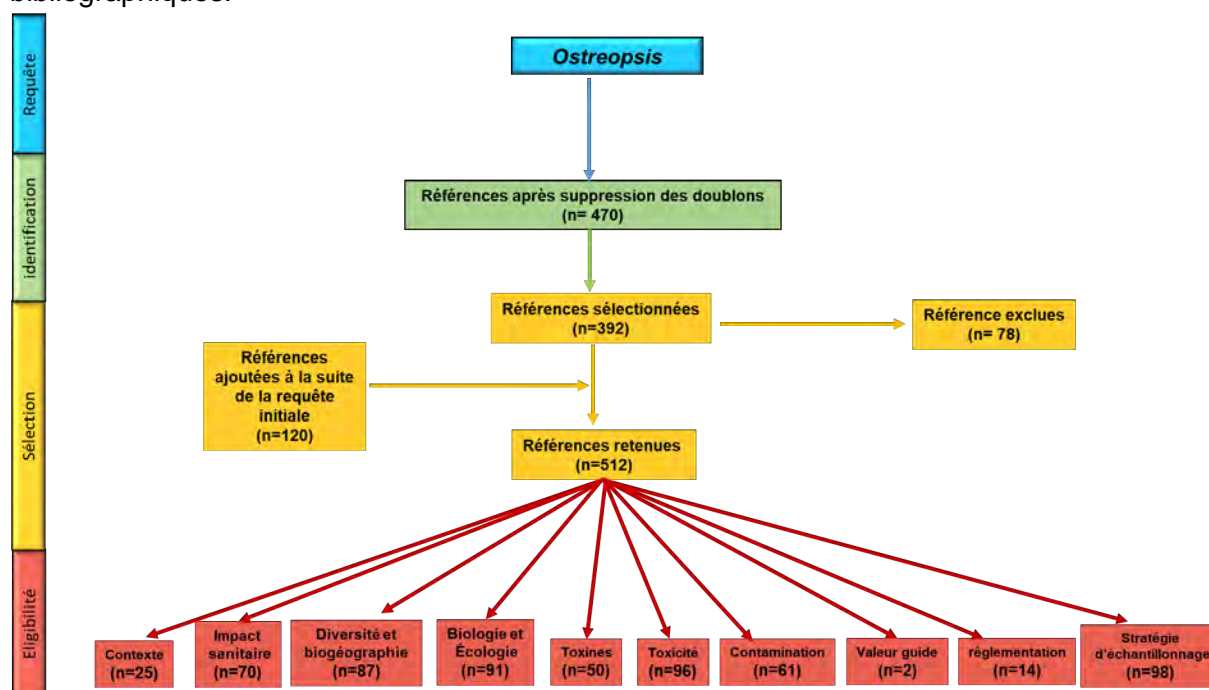


Figure 1 : Diagramme PRISMA de sélection d'articles

1.6.2 Bibliographie relative au chapitre sur la contamination des produits de la mer

La rédaction du chapitre relatif à la contamination des produits de la pêche s'est basée sur une recherche approfondie spécifique de la littérature, réalisé en utilisant des termes complémentaires à la première requête, selon les étapes présentées dans les tableaux I et tableaux II .

Tableau I : Cadrage de la recherche des articles

| Thématique | Mots-clés |
|--|---|
| Population (ou sujets étudiés) | Produits de la mer : coquillages, poissons, crustacés |
| Intervention / Exposition : Facteur d'exposition de la population | Exposition à <i>Ostreopsis</i> et ses toxines : palytoxine, ostréocines, ovatoxines, mascalénotoxines |
| Comparateur (scénario de référence contre lequel la population exposée est comparée) | Sans objet |
| Résultat d'intérêt mesuré | Concentrations en toxines |
| Temporalité (Périodes de recherche) | Pas de limite de temps |

Tableau II : Sélection des articles

| Recherche n°1 | |
|--------------------------------------|--|
| Base de données | SCOPUS |
| Phrase de recherche | (TITLE-ABS-KEY (palytoxin* OR <i>Ostreopsis</i>) AND TITLE-ABS-KEY (seafood OR shellfish OR fish)) |
| Date | 27 juin 2022 |
| Nombre de références trouvées | 250 |
| Recherche n°2 | |
| Base de données | SCOPUS |
| Phrase de recherche | (TITLE-ABS-KEY (palytoxin* OR ostreocin* OR ovatoxin* OR mascalénotoxin*) AND TITLE-ABS-KEY (contamination)) |
| Date | 27 juin 2022 |
| Nombre de références trouvées | 53 |
| Recherche n°3 | |
| Base de données | PUBMED |
| Phrase de recherche | (palytoxin*[Title/Abstract] OR <i>ostreopsis</i> [Title/Abstract]) AND (seafood[Title/Abstract] OR shellfish[Title/Abstract] OR fish[Title/Abstract]) |
| Date | 27 juin 2022 |
| Nombre de références trouvées | 114 |
| Recherche n°4 | |
| Base de données | PUBMED |
| Phrase de recherche | (palytoxin*[Title/Abstract] OR ostreocin*[Title/Abstract] OR mascalénotoxin*[Title/Abstract] OR ovatoxin*[Title/Abstract]) AND (contamination[Title/Abstract]) |
| Date | 27 juin 2022 |
| Nombre de références trouvées | 7 |
| Elimination des références en double | |

| | |
|--|--------------------------------------|
| Nombre total de références (somme des bases de données) | 424 |
| Nombre de références en double détectées par EndNote | 146 |
| Références supplémentaires trouvées en double par le rédacteur | 17 |
| Nombre final sans les références en double | 261 |
| Date | 27 juin 2022 |
| Etape de sélection (titre et résumé, et article en entier en cas de doute) | |
| Nombre de références exclues car ne répondant pas aux critères d'inclusion | 248 |
| Nombre de références retenues pour l'analyse | 13 |
| Références additionnelles non identifiées par la requête | 1 |
| Date | 27 juin au 28 juillet 2022 |
| Articles également retenus car comportant des informations intéressantes mais ne répondant pas aux critères d'inclusion | |
| Nombre de références incluses dans l'analyse (cas d'intoxication par des produits de la mer sans quantification des toxines) | 13 (dont 3 articles de revue) |
| Nombre de références incluses dans l'analyse (contamination par PLTX des produits de la mer sans quantification des toxines) | 5 |
| Date | 27 juin au 28 juillet 2022 |

Les critères d'inclusion sont les données de contamination en toxines d'*Ostreopsis* dans les produits de la mer.

Les critères d'analyse de la qualité et la robustesse des données retenus sont les résultats détaillés de contamination en toxines d'*Ostreopsis* dans les produits de la mer (espèce, nombre d'échantillons, concentrations, méthode analytique).

Sont exclues les données de contamination obtenues par exposition en laboratoire et les données sur des organismes non comestibles (par exemple les coraux mous).

La veille bibliographique a permis d'identifier un article supplémentaire, publié le 1^{er} octobre 2022.

2 Impacts sanitaires des proliférations d'*Ostreopsis* et des toxines associées

2.1 Historique des intoxications humaines

Dès les années 1970 et au début des années 1980, plusieurs publications rapportent des observations d'intoxications graves après ingestion de crabes tropicaux (Halstead, 1970 ; Alcalá *et al.*, 1970 ; Gonzales *et al.*, 1977 ; Alcalá, 1983 ; Alcalá *et al.*, 1988 ; Lau *et al.*, 1995 ; Llewellyn, 2001 ; Asakawa *et al.*, 2010). Les espèces de crabes *Atergatis floridus*, *Demania reynaudii*, *Lophozozymus pictor* et *Zosimus aeneus*, étaient impliquées dans des intoxications, parfois mortelles, d'humains les ayant ingérés. Le tableau clinique rapporté était caractérisé par une atteinte multiviscérale avec hypersudation, vomissements et diarrhées quelques minutes après le repas, puis crampes musculaires, cyanose périphérique, bradycardie intense, insuffisance rénale, convulsions généralisées avec perte de connaissance et détresse respiratoire pouvant aboutir au décès en quelques heures (plusieurs décès entre 1 à 16 heures après le repas) (Alcalá, 1983). L'ensemble de ces signes et symptômes évoquait aux auteurs de ces observations, la présence d'une toxine aux puissants effets vasoconstricteurs. En 1985, Fusetani *et al.* rapportent au Japon dans une étude rétrospective portant sur la période 1953-1983, 52 intoxications dont quatre décès, au tableau clinique similaire après ingestion du poisson perroquet *Scarus ovifrons*. Cette publication a été rapidement suivie par d'autres cas similaires rapportés, toujours au Japon et toujours avec cette espèce de poisson, au cours de la seconde moitié des années 1980 et dans les années 1990 (Ichida, 1988 ; Okano *et al.*, 1998 ; Yoshimine *et al.*, 2001). En 1987, une autre équipe japonaise met en évidence, avec les méthodes analytiques de l'époque, la présence de PLTX dans la chair (restes de repas) d'un spécimen de *Scarus ovifrons* ayant entraîné l'intoxication de deux patients dont l'un était décédé (Noguchi *et al.*, 1987). En 1988, c'est dans la chair d'un crabe du genre *Demania*, ayant entraîné la mort d'un patient aux Philippines, qu'une équipe japonaise retrouve aussi la PLTX (Alcalá *et al.*, 1988). À partir de ces travaux, avait émergé, dans la littérature médicale, la notion de syndrome appelé « Palytoxicose » (en anglais « Palytoxicosis ») qui est désormais une appellation obsolète et abandonnée. À l'époque, la « Palytoxicose » était donc le nom donné aux intoxications par crustacés tropicaux décapodes et par certaines espèces de poissons contaminés par la PLTX (Suzuki *et al.*, 2013 ; de Haro, 2021). Au cours des années 1990 et au début des années 2000, plusieurs cas de « Palytoxicose » ont été rapportés en Asie après ingestion d'autres espèces de poissons (poissons-coffres des genres *Ostracion* et *Lactoria*, mérour *Epinephalus bruneus*, Poisson-lune *Masturus lanceolatus* à Taiwan) (Taniyama *et al.*, 2002 ; Taniyama *et al.*, 2009 ; Huang *et al.*, 2011).

À la même période, des observations d'intoxications humaines sévères et parfois mortelles sont rapportées dans des contextes fort différents puisqu'elles survenaient après ingestion de petits poissons pélagiques et planctonophages (Kodama *et al.*, 1989 ; Deeds *et al.*, 2010 ; de Haro, 2021). Le tableau clinique est difficile à préciser car ces observations sont rares, disséminées dans des îles isolées et sans prise en charge médicale adéquate. Les signes et symptômes rapportés font état (i) de troubles digestifs quelques minutes après le repas (gastralgies, vomissements, diarrhée hydrique et incoercible) toujours associés à la description d'un goût métallique puissant puis (ii), de signes et symptômes graves mettant rapidement en jeu le pronostic vital (convulsions, voire état de mal épileptique, paralysie périphérique mais aussi respiratoire). Le nom alors donné à ce type d'intoxication était

« Clupéotoxisme » car les premières espèces de poissons identifiées comme responsables de ces intoxications appartenaient à la famille des clupéidés (famille qui regroupe entre autres les sardines). Cependant, d'autres familles de poissons planctonophages, à l'exemple de celle des engraulidés (anchois), ont aussi été impliquées dans ce type d'intoxication (Randall, 2005). Deux études japonaises, la première portant sur des restes de *Decapterus macrosoma* (carangidé planctonophage au comportement de maquereau) à l'origine d'une intoxication grave à Hawaï (Kodama *et al.*, 1989), et la seconde portant sur la tête de sardines tropicales (*Herklotsichthys quadrimaculatus*) à l'origine d'une intoxication mortelle à Madagascar (Onuma *et al.*, 1999), ont montré que les toxines en cause étaient probablement des analogues de la PLTX (toxines PLTX-like). Enfin, une publication taiwanaise a mis en évidence la présence d'analogues de la PLTX dans des restes de soupe à base de la même espèce tropicale, *Herklotsichthys quadrimaculatus*, à l'origine de l'intoxication de sept membres d'une même famille de pêcheurs (dont un décès) au sud-est du pays (Ming-Ling *et al.*, 2014).

Dès le début des années 2000, plusieurs toxicologues cliniciens se sont demandés si « Palytoxicose » et « Clupéotoxisme » n'étaient pas deux appellations distinctes d'un même toxidrome induit par la consommation de produits de la mer contaminés par la PLTX et/ou des PLTX-like (Tanyama *et al.*, 2003 ; Randall, 2005). Deux arguments ne sont pas en faveur de cette unité sémiologique : d'une part la notion de goût métallique retrouvé systématiquement lors des cas de « Clupéotoxisme » n'a jamais été rapportée lors des observations de « Palytoxicose » ; d'autre part les organismes marins associés à ces intoxications ne vivent pas dans les mêmes biotopes et ne devraient donc pas bio-accumuler les mêmes toxines (organismes benthiques, crustacés et poissons, pour la « Palytoxicose » et poissons pélagiques planctonophages pour le « Clupéotoxisme »). Concernant le premier argument, il est cependant permis de se demander si les médecins asiatiques ayant rapporté de façon rétrospective les observations de « Palytoxicose » n'ont tout simplement pas recherché cette notion de goût métallique maintenant bien connue (de Haro, 2021). De même, concernant le second argument qui se rapporte aux différences de biotopes, on sait désormais que la palytoxie et ses toxines associées sont à la fois produites dans le compartiment benthique (coraux mous, dinoflagellés du genre *Ostreopsis*) et dans le compartiment planctonique (cyanobactéries du genre *Trichodesmium*) (Kerbrat *et al.*, 2011), ce qui pourrait expliquer les deux origines toxiques possibles pour les deux types d'intoxication. Ainsi, l'appellation « Palytoxicose » n'est plus employée en toxicologie clinique alors que le « Clupéotoxisme » est parfois encore retrouvé pour décrire ces intoxications violentes après ingestion de poissons (Randall, 2005 ; Deeds *et al.*, 2010).

2.2 Proliférations d'*Ostreopsis* sur les côtes méditerranéennes

Au début des années 2000, les connaissances médicales sur le potentiel impact clinique de la PLTX et de ses analogues se limitent aux données éparses rapportées après ingestion dans des zones tropicales reculées et peu médicalisées. Ce type d'intoxication était donc peu connu en Europe et considéré comme exotique. La situation a cependant rapidement évolué lorsque les premières proliférations d'*Ostreopsis* ont été décrites en Méditerranée.

2.2.1 Données colligées en Italie

L'Italie a été le premier pays méditerranéen concerné à grande échelle, par des expositions d'humains à des aérosols lors d'efflorescences d'*Ostreopsis*. Les premiers rapports sur l'association potentielle entre des proliférations d'*Ostreopsis* et des cas symptomatiques datent des étés 1998, 2000 et 2001 le long de la côte toscane (Sansoni *et al.*, 2003) et le long de la côte de Bari (sud de la mer Adriatique) en 2001 (Di Turi *et al.*, 2003). Par la suite, lors de deux proliférations d'*Ostreopsis* survenues en 2003 et 2004 le long des côtes de Bari, 28 personnes exposées à des aérosols marins au cours d'activités récréatives ou professionnelles ont développé un ensemble de signes et symptômes : rhinorrhée abondante, toux sèche ou peu productive, bronchoconstriction avec dyspnée légère et respiration sifflante à l'auscultation thoracique, hyperthermie (dans 100 %, 42,9 %, 25 % et 14,3 % des cas, respectivement), conjonctivite. L'état de santé d'aucun des patients n'a nécessité d'hospitalisation. Des inhalateurs/nébuliseurs de β 2-agonistes (salbutamol) pour le bronchospasme, des décongestionnants nasaux et du paracétamol pour la fièvre ont été administrés comme traitement symptomatique. La description épidémiologique de l'évènement a montré que la plupart des signes et des symptômes sont apparus et ont disparu très rapidement, lorsque les sujets ont quitté la plage. Bien qu'il n'ait pas été possible d'établir une relation causale directe entre la prolifération des algues et les symptômes observés, la concomitance entre la survenue de ces symptômes et la présence d'efflorescences d'*Ostreopsis*, puis entre leur disparition rapide et la diminution de l'abondance des *Ostreopsis*, suggérait l'existence d'un lien entre ces évènements (Gallitelli *et al.*, 2005). En septembre 2008, des dermatites développées par des pêcheurs travaillant le long de la côte des Pouilles (Italie du Sud) ont également été attribuées à *Ostreopsis* mais aucune analyse de PLTX n'a été réalisée pour confirmer ce lien. Lors de cet évènement, plus de $11,2 \cdot 10^7$ cell.L⁻¹ d'*Ostreopsis* avaient été dénombrées dans l'eau collectée directement dans les filets de pêche (Ungaro, communication personnelle).

Des cas d'expositions symptomatiques survenus après contact avec des aérosols d'eau de mer pendant les périodes d'efflorescences d'*Ostreopsis* ont également été décrits dans les régions de Gênes et de La Spezia au cours de la période 2005-2006. Des analyses d'eau de mer ont montré la présence de fortes densités d'*Ostreopsis* et, pour la première fois, de toxines du groupe de la PLTX (PLTX et d'ovatoxine (OVTX-a) (Brescianini *et al.*, 2006, Ciminiello *et al.*, 2006, Ciminiello *et al.*, 2008). Ainsi, à la mi-juillet 2005, 209 patients ont nécessité des soins médicaux dans plusieurs services d'urgence de l'hôpital de Gênes après des activités récréatives ou professionnelles sur la plage. Le tableau clinique était principalement caractérisé par une hyperthermie, des signes et symptômes irritatifs des voies respiratoires supérieures et inférieures, des conjonctives. Le temps moyen d'apparition des signes et symptômes était de 4h30 après le début de l'exposition. Sur l'ensemble des patients (209), 43 (20,6 %) ont nécessité une hospitalisation (durée d'hospitalisation de 24 à 72 h) (Durando *et al.*, 2007).

Immédiatement après les premiers cas, des enquêtes cliniques, épidémiologiques et environnementales locales ont été activées. À l'issue de ces enquêtes, une définition de cas a été établie sur la base des données anamnestiques et cliniques les plus significatives (définition de cas reprise dans la publication Tubaro *et al.*, 2011), notamment :

- présence en bord de mer (< 90 m du rivage), en concomitance avec une prolifération d'*Ostreopsis* ;
- consultation dans un service d'urgence d'un hôpital ;

- présence d'au moins deux des signes ou symptômes suivants : toux, dyspnée, mal de gorge, rhinorrhée, fièvre ≥ 38 °C, céphalées, larmoiements, nausées/vomissements et dermatite.

L'analyse biologique pendant la phase aiguë pour 82 patients (39,2 % ; tous les cas hospitalisés auxquels s'ajoutaient des patients ayant exprimé leur consentement) a montré une légère leucocytose (nombre moyen de globules blancs : $13\,900 \pm 3\,400$.mm⁻³ ; intervalle : 10 100–23 900.mm⁻³) et une neutrophilie (moyenne : $82,2 \pm 4,7$ % ; intervalle : 75,2–91,5 %) dans 46,3 % et 40,2 % des cas, respectivement. Aucune altération significative des autres paramètres hématologiques n'a été enregistrée (valeurs normales des transaminases, γ -GT, créatinine et vitesse de sédimentation). Tous les examens électrocardiographiques et les radiographies pulmonaires ont donné des résultats négatifs. Les traitements étaient symptomatiques : administration de corticoïdes *per os* et en inhalation, anti-inflammatoires non stéroïdiens, β 2-agonistes en aérosols (bronchodilatateurs), si besoin oxygénothérapie pour les patients présentant une dyspnée. L'enquête épidémiologique a montré qu'aucune des variables de risque étudiées lors de l'épidémie (la baignade, la distance à la mer, la durée du séjour sur la plage), ni des antécédents personnels et médicaux (âge, sexe, comorbidité) n'apparaissait comme pertinente.

Au cours de l'été 2006, 19 autres sujets ont présenté les signes et symptômes décrits ci-dessus alors qu'une nouvelle efflorescence d'*Ostreopsis* était rapportée dans la même zone. La description clinique de ces patients était similaire à celle décrite l'année précédente (Durando *et al.*, 2007).

Après l'épidémie de 2005, un réseau local de surveillance des syndromes d'urgence a été mis en place à Gênes pour permettre une détection précoce de cinq syndromes prédéfinis (Ansaldi *et al.*, 2008, Ansaldi *et al.*, 2009). Depuis 2006, aucun signal compatible avec la survenue d'épidémies de "syndrome algal", n'a été notifié par les services d'urgence ou enregistré par le système de surveillance des syndromes à Gênes, même lorsque des efflorescences importantes d'*Ostreopsis* se sont produites.

2.2.2 Données colligées dans d'autres pays du pourtour méditerranéen

En Croatie (nord de la mer Adriatique), des cas de patients ayant présenté des signes et symptômes irritatifs respiratoires et cutanés associés à des proliférations massives d'*Ostreopsis cf. ovata* ont été signalés pour la première fois en 2010 (Pfannkuchen, 2012). En 2015, des cas similaires ont été rapportés sur des plages le long des côtes de la baie de Kaštela (Croatie), simultanément avec le développement d'une autre efflorescence d'*Ostreopsis cf. ovata*. Depuis ces premières descriptions, d'autres proliférations de cette microalgue avec intoxications humaines ont été signalées en Espagne (Barroso *et al.*, 2008 ; Vila *et al.*, 2016). De même, plusieurs centaines d'intoxications ont été observées au cours de l'été 2009 lors de proliférations en Algérie (Iddir-Ihaddaden *et al.*, 2013). En France, si des intoxications avérées ont été observées depuis le début des années 2000 entre Marseille et Menton, les urgences médicales n'ont jamais été saturées par l'arrivée concomitante de plusieurs dizaines de patients (Kermarec *et al.*, 2008 ; Tichadou *et al.*, 2010).

2.3 Proliférations d'*Ostreopsis* sur la côte atlantique

2.3.1 Données colligées au Sénégal

Les microalgues du genre *Ostreopsis* sont impliquées depuis 2010 ou 2011 dans l'apparition soudaine de phénomènes irritatifs et inflammatoires chez des surfeurs ou des baigneurs, en été, au niveau de la presqu'île du Cap Vert au Sénégal, et plus particulièrement au niveau de la commune de Ngor près de Dakar. Le phénomène s'est amplifié en 2016 lors d'une compétition de surf au cours de laquelle de nombreux compétiteurs et spectateurs ont été intoxiqués (tableau clinique en tous points comparables à ceux décrits en Méditerranée). Cependant, ce n'est qu'en 2021 (le 11 juillet au sud de Dakar et le 15 août au nord de la presqu'île) que deux proliférations d'*Ostreopsis* ont été documentées sur cette presqu'île du Cap Vert (Brehmer *et al.*, 2021).

2.3.2 *Ostreopsis* au Pays Basque français en 2021, données médicales

En juin 2022, un article du bulletin des vigilances de l'Anses (Paradis et Labadie, 2022) rapporte des informations médicales et épidémiologiques relatives aux épisodes de proliférations d'*Ostreopsis* sur la côte basque française.

Le cinq août 2021, un baigneur à Hendaye demande l'avis du Centre antipoison et de toxicovigilance (CAPTV) de Bordeaux. Ce patient vient de se baigner et est inquiet car l'eau de mer présente une odeur désagréable et inhabituelle. Il présente de plus une irritation cutanée des quatre membres et un goût métallique gênant. Des signes cliniques sont apparus rapidement, évoquant un syndrome pseudo-grippal avec dès la sortie de l'eau, rhinite et rhinorrhée et toux irritative. Plusieurs membres de sa famille, restés sur la plage car gênés par l'odeur, présentent également des signes et symptômes pseudo-grippaux : nausées, céphalées, myalgies, tremblements et hyperthermie. Lors de la discussion entre le patient et le médecin toxicologue du CAPTV de Bordeaux, les intervenants comprennent bien que cet épisode se déroule en pleine épidémie de COVID19 dont le tableau clinique inclut la totalité des symptômes rapportés par cette famille, y compris la dysgueusie. Cependant, le développement du même tableau clinique en quelques dizaines de minutes par tous les membres de cette famille présents sur la plage est plus en faveur d'une origine toxique que d'une étiologie infectieuse. De plus, les contrôles par PCR pour les personnes les plus atteintes (dont l'appelant qui s'était baigné) et par tests antigéniques, pour les autres membres de la famille, sont tous revenus négatifs. Enfin, malgré une très mauvaise nuit décrite par le patient et sa famille, tous les symptômes avaient fortement diminué dès le lendemain matin pour l'ensemble des patients (évolution trop rapide pour un épisode infectieux). Ce premier signalement a été suivi, dès le lendemain, par des dizaines d'autres tout à fait similaires.

Le CAPTV de Bordeaux a colligé 674 cas humains mais ces données n'ont aucune prétention d'exhaustivité. Du point de vue clinique, le tableau présenté fut en tout point compatible avec ce qui est décrit plus haut, avec une majorité de dossier pour lesquels les symptômes uniquement irritatifs n'ont pas nécessité de prise en charge médicale autre que l'appel téléphonique au CAPTV (traitements basés sur la décontamination et sur des molécules à visée symptomatique). Pour 150 patients, une consultation médicale a été demandée et au final 22 patients ont été considérés comme présentant un tableau de gravité moyenne selon

le PSS2 (Poisoning Severity Score) (bronchorrhée et/ou bronchospasmes, dyspnée, état de mal asthmatiforme) et 14 d'entre eux ont été pris en charge à l'hôpital. Il n'y a eu aucun cas de gravité sévère et tous les patients ont évolué favorablement, en insistant cependant sur le fait que, dans plusieurs cas d'expositions répétées, les symptômes ont perduré plusieurs jours (avec un maximum de 15 jours pour des personnes exposées de façon professionnelle). Les données du CAPTV de Bordeaux confirment par ailleurs que les patients sont à 97% exposés lors d'une activité dans l'eau, mais que des patients se trouvant à proximité de la mer, sans contact direct avec l'eau (3% des cas), peuvent aussi présenter des signes et des symptômes. De plus, 13% des patients déclarent avoir été exposés lors d'une activité professionnelle (maîtres-nageurs, moniteurs d'écoles de surf, plagistes, restaurateurs). Enfin, des cas ont été rapportés sur la quasi-totalité des plages du Pays Basque français. Lors de la réunion plénière du GT « *Ostreopsis* » du 19 avril 2022, un représentant de l'ARS Nouvelle Aquitaine a été auditionné pour présenter les données collectées par leurs services. Ces données sont très proches de celles du CAPTV de Bordeaux avec lequel l'ARS concernée a l'habitude de travailler. On note cependant quelques points qui méritent d'être soulignés. Tout d'abord, selon les données de l'ARS, il semble que les premières observations datent de l'été 2020, uniquement sur une plage d'Hendaye, avec des tableaux cliniques irritatifs simples qui, à l'époque, n'ont pas été étiquetés et pour lesquels il n'y a pas eu de dossier au CAPTV de Bordeaux. Aucun diagnostic n'a été posé en cette période de post confinement après la première vague de la pandémie COVID19. Concernant l'été 2021, l'ARS a recensé les cas d'intoxications déclarés entre le 1er et le 20 août 2021 (période d'étude différente de celle du CAPTV de Bordeaux) sur l'ensemble des plages du Pays Basque, mais cinq d'entre elles concentraient, à elles seules, 60% des cas. Du point de vue clinique, le représentant de l'ARS souligne la relative bénignité des cas colligés, sans cas de gravité sévère et avec seulement 22 cas de gravité moyenne selon le système de gradation international des intoxications (PSS2). Cet intervenant a insisté sur le nombre élevé de tremblements rapportés, tout en sachant que les symptômes tremblements / frissons / frilosité font partie du syndrome pseudo-grippal caractéristique des expositions respiratoires lors de proliférations d'*Ostreopsis*.

2.4 Tableau clinique des cas

C'est en se basant sur les données colligées en Italie, en Espagne, en France, à Monaco et en Algérie lors de la gestion des clusters de patients exposés à des *Ostreopsis*, que le tableau clinique a pu être précisé, puis confirmé (Tubaro *et al.*, 2011 a; Schmitt *et al.*, 2013 ; Funari *et al.*, 2015).

Ainsi, le tableau clinique d'une exposition à *Ostreopsis* dépend de la phase de développement de l'algue au moment de cette exposition (Tableau III). Lorsque les microalgues sont fixées sur un support solide (ex : macrophytes), les baigneurs n'ont qu'un contact cutané avec elles. Plusieurs cas de personnes ne présentant que des atteintes dermatologiques ont ainsi été rapportés chez des patients s'étant déplacés parmi des macroalgues ou des posidonies : on constate alors des lésions cutanées irritatives ayant des contours bien délimités (zone de contact direct) allant d'un simple érythème prurigineux à de véritables zones nécrotiques. Dans cette situation, il n'y a aucun signe systémique (pas d'atteinte respiratoire, pas de fièvre ou de syndrome inflammatoire).

Lorsque les *Ostreopsis* qui prolifèrent se détachent de leurs supports et se trouvent dans la colonne d'eau (compartiment planctonique), le tableau clinique des patients exposés change radicalement. S'il est toujours possible d'observer des atteintes de la peau, il s'agit alors

d'irritations non limitées à une zone précise telles des érythèmes diffus et des prurits généralisés. De plus, sont observées des atteintes des muqueuses nasales, oculaires et buccales avec conjonctivite, de la dysgueusie à type de sensation de goût métallique parfois intense et toujours désagréable, une hypersécrétion associée selon les muqueuses atteintes, à des rhinorrhées, une hypersalivation ou des larmoiements. À ce stade, les premières difficultés respiratoires avec sensation de gêne à l'inspiration, de brûlure rétro-sternale et de chaleur thoracique peuvent être déjà observées.

C'est lors de proliférations massives de la microalgue et sous certaines conditions météorologiques (vent, hydrologie) que l'on peut observer les tableaux cliniques les plus sévères : hypersécrétion généralisée avec comme signe de gravité une bronchorrhée pouvant générer un bronchospasme et une éventuelle détresse respiratoire. À ce stade, d'autres signes de gravité peuvent être observés (kératite aseptique, ulcères buccaux, état de mal asthmatiforme) et des signes et symptômes systémiques sont rapportés : syndrome inflammatoire évoquant un syndrome pseudo-grippal avec fièvre, frissons, asthénie, arthralgies, myalgies, perturbations biologiques (hyperleucocytose, vitesse de sédimentation accélérée sans signe de surinfection). En Méditerranée, les cas les plus graves ont été observés dans deux circonstances distinctes : d'une part chez les patients ayant des antécédents respiratoires notables (patients asthmatiques, atteints de bronchopneumopathie chronique obstructive - BPCO - ou insuffisants respiratoires) et d'autre part chez des plongeurs avec bouteilles d'air comprimé car le détendeur produit des microgouttelettes permettant une plus grande diffusion des toxines et/ou des *Ostreopsis* en suspension (en France et à Monaco, plusieurs plongeurs en pleine forme physique ont présenté des atteintes respiratoires sévères comme s'il avaient des antécédents broncho-pulmonaires) (Tichadou *et al.*, 2010).

Du point de vue thérapeutique, l'expérience des équipes ayant géré des arrivées soudaines de plusieurs dizaines de patients intoxiqués au même moment dans des structures d'urgence le plus souvent inadaptées, démontre que la prise en charge est purement symptomatique et assez simple : décontamination à ne jamais oublier ; en cas de lésion cutanée et selon l'intensité, utilisation des topiques corticoïdes et si besoin des topiques antibiotiques ; en cas d'atteinte d'une muqueuse, le rinçage abondant doit être complété si besoin par des collyres cicatrisants ; administration de bronchodilatateurs dès les premiers signes ou symptômes de dyspnée, de bronchorrhée ou de bronchospasme ; en cas de syndrome pseudo-grippal, les médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens classiques (ibuprofène, kétoprofène, naproxène) semblent être parfaitement efficaces pour écourter le tableau clinique. Ces médicaments ayant de nombreux effets secondaires et des contre-indications, leur utilisation n'est préconisée qu'après un avis médical. La difficulté majeure lors de la prise en charge de ces patients n'est pas liée à la complexité thérapeutique mais bien plus à la quantité de travail induite par le nombre élevé des patients se présentant en même temps dans les services d'urgence (Ciminiello *et al.*, 2006 ; de Haro, 2021).

Tableau III : Tableau clinique des expositions, à *Ostreopsis* ou aux toxines du groupe de la PLTX, produites par le corail mou.

| Voie d'exposition | Circonstances | Tableau clinique |
|-------------------------------|--|---|
| Exposition par voie digestive | Consommation de certains crustacés décapodes, poissons perroquets (voire | Goût métallique, hypersudation, vomissements, diarrhées, crampes, myalgies, cyanose, bradycardie, anurie, |

| | | |
|---|---|---|
| | d'autres poissons benthiques), poissons planctonophages. | insuffisance rénale, convulsions, arrêt respiratoire, défaillance multiviscérale avec atteinte anoxique poly-organique concomitante (vasoconstriction évoquée). |
| Exposition cutanée seule | Déplacement parmi des macrophytes, manipulation et/ou entretien d'aquariums récifaux | Lésions cutanées isolées allant de la simple irritation à de véritables nécroses ou ulcères. Absence de signe et symptôme systémiques. |
| Exposition muqueuse et respiratoire | Baignades, activités nautiques, inhalation d'aérosols lors de séjour à la plage, riverains de la côte, séjour dans une pièce où se trouve un aquarium récifal où un corail mou est mort. | Goût métallique, rhinorrhée, hypersalivation, conjonctivite, larmoiement, irritation laryngée, irritation cutanée diffuse, asthénie, toux irritative, céphalées. |
| Exposition à d'importantes quantités, à des quantités mal tolérées ou répétées de microgouttelettes | Professionnels multi-exposés (agents en charge de prélèvements, professionnels de la mer et des activités nautiques, professionnels de l'aquariophilie), antécédents respiratoires, plongeurs avec bouteilles (pour l'instant, pas de cas rapporté d'intoxication grave lors de la pratique de la plongée avec palmes/masque/tuba). | Tous les symptômes de la case ci-dessus en plus intense, accompagnés d'un syndrome pseudo-grippal (myalgies, arthralgies, fièvre, frissons, tremblements, syndrome inflammatoire biologique) et potentiellement compliqués par des signes de gravité : Kératite, ulcères buccaux, dyspnée, cyanose, bronchorrhée, bronchospasme, détresse respiratoire. |

(Source : Berdalet *et al.*, 2022)

2.5 Aquarium récifaux et exposition à la palytoxine

La PLTX doit son nom à une espèce de corail mou, *Palythoa toxica* (Gleibs *et al.*, 1999). Alors que les centres antipoison européens étaient confrontés aux blooms estivaux d'*Ostreopsis* en Méditerranée dès le début des années 2000, les toxicologues cliniciens ont rapidement été confrontés à une problématique similaire mais dans des circonstances fort différentes. À partir du début des années 2000, une des modes de l'aquariophilie était de maintenir, dans des volumes d'eau restreints, des invertébrés marins alors que cela était auparavant réservé à des spécialistes chevronnés. Ainsi était née la notion d'aquarium récifal dont le but est d'avoir à domicile son récif corallien miniature (avec des poissons qui sont relégués au second plan, voire totalement absents). Dans ces mini récifs coralliens, des coraux mous ont été introduits, soit volontairement en raison de leurs couleurs chatoyantes, soit involontairement lors d'achat de pierres dites « vivantes » qui hébergent des larves de multiples invertébrés sessiles. La présence des genres *Palythoa*, *Zoanthus* ou *Parazoanthus* peut alors rendre possible la production de PLTX. Les expositions accidentelles surviennent lorsque le ou les coraux mous producteurs sont abîmés ou détruits, par exemple lors de l'entretien de l'aquarium. Les premiers accidents ont été décrits aux USA (Hoffman *et al.*, 2008 ; Nordt, 2011 ; Hall *et al.*, 2015, Farooq *et al.*, 2017), mais très rapidement, l'ensemble des pays occidentaux a été concerné, de l'Australie en passant par l'Europe où tous nos voisins ont rapporté des cas

(Wieringa *et al.*, 2011 ; Sud *et al.*, 2013 ; Tartaglione *et al.*, 2016 a et b; Schmitt *et al.*, 2018). En France, une synthèse des observations colligées par les centres antipoison a été publiée en 2019 (Calon *et al.*, 2019) ; elle a permis de bien décrire cette nouvelle façon de s'exposer à la PLTX (premiers cas français en 2006 et phénomène émergent depuis avec six observations concernant 14 patients en 2017 sur le territoire national) (Calon *et al.*, 2019). Il faut noter que le tableau clinique et les traitements sont totalement similaires à celui décrit ci-dessus avec les proliférations d'*Ostreopsis* : signes cutanés allant de la simple irritation à des phénomènes nécrotiques potentiellement importants, atteintes oculaires pouvant être graves avec plusieurs cas de kératites, voire de perte définitive de points d'acuité visuelle, atteintes respiratoires à type de bronchorrhées et de bronchospasmes ; à noter une bonne efficacité des AINS (anti inflammatoires non stéroïdiens) après une décontamination efficace² (Moshirfar *et al.*, 2010 ; Schmitt *et al.*, 2018). Plusieurs points caractérisant ce mode d'exposition doivent être soulignés. Tout d'abord, les systèmes de ventilation et de production de bulles dans les aquariums sont à l'origine d'un phénomène d'aérosolisation qui peut aboutir à la libération soudaine de grandes quantités de PLTX dans l'atmosphère de la pièce où se trouve l'aquarium (plusieurs cas d'intoxications collectives de familles entières en France, en Allemagne, aux USA ou en Australie) (Deeds *et al.*, 2010 ; Pelin *et al.*, 2016 a; Schmitt *et al.*, 2018 ; Chang *et al.*, 2020 ; de Haro, 2021). Cette contamination peut apparaître brutalement lorsqu'un spécimen de corail mou meurt, lors d'une erreur de manipulation au cours de l'entretien ou tout simplement en raison d'une dégradation de la qualité de l'eau de l'aquarium. Il existe sur internet de multiples alertes et fiches d'information dans plusieurs langues produites par des associations d'aquariophiles. Ce risque est désormais bien mieux connu mais des cas sont toujours rapportés malgré ce travail de prévention. Enfin, il existe des travailleurs exposés professionnellement (personnel d'animaleries, personnel d'aquariums ouverts au public, personnel de société d'entretien d'aquariums privés) chez lesquels les conditions de travail doivent être encore améliorées (information, formation, protections individuelles) (Calon *et al.*, 2019).

2.6 Diagnostics différentiels

2.6.1 La dysgueusie avec goût métallique

Si l'on étudie en détail le toxidrome rapporté après exposition à la PLTX et à ses analogues, ou à l'eau et/ou aux aérosols lors de proliférations d'*Ostreopsis* (tableau 1), il est constaté que la quasi-totalité des signes et symptômes pourrait être qualifiée d'aspécifique (signes et symptômes pouvant être induits par de nombreux autres agents étiologiques toxiques, allergènes, xénobiotiques ou infectieux). Seule la dysgueusie avec description d'un goût métallique parfois intense et gênant est relativement « originale » dans ce toxidrome, et ce malgré le fait que la dysgueusie soit aussi un signe clinique bien connu de la COVID19.

² Une « décontamination efficace » est un terme médical désignant :

- En cas de contact oculaire ou de symptomatologie oculaire, un rinçage à l'eau claire d'au moins 10 minutes
- En cas de contact cutané, il faut évaluer la surface atteinte. Rinçage à l'eau claire d'au moins 10 minutes si un seul segment de membre est atteint. Douche complète à l'eau claire d'au moins 10 minutes dans tous les autres cas (un membre entier atteint, tronc atteint) avec isolement des vêtements à mettre directement dans une machine à laver. Penser au shampoing si suspicion de contact avec la chevelure.

Cependant, la dysgueusie de la COVID19 est induite par des lésions des nerfs sensitifs avec pour conséquence une évolution lente de plusieurs jours à plusieurs mois. Dans le cas des dysgueusies lors de contacts avec *Ostreopsis* ou ses toxines, le goût métallique apparaît dès l'exposition et disparaît rapidement après la fin de cette exposition. Les associations d'aquariophiles anglophones mettent en avant ce symptôme qui doit, pour elles, être un signe d'alerte : ainsi, des fiches d'information et plusieurs sites Internet expliquent que si vous possédez un aquarium récifal et que vous percevez un tel goût métallique lorsque vous vous trouvez dans la pièce où se trouve l'aquarium, il faut immédiatement se protéger (porter un masque, quitter la pièce si vous n'avez pas de protection), tenter de décontaminer les lieux (ouvrir les fenêtres) et ne plus s'exposer sans l'avis d'un professionnel. La sensation de goût métallique peut donc être considérée comme le seul symptôme plus ou moins spécifique et permettant d'écarter d'autres diagnostics, notamment infectieux ou allergiques (de Haro, 2021).

2.6.2 Les épistaxis isolées

Une part importante du tableau clinique est la conséquence d'une irritation cutanéomuqueuse qui induit des signes et symptômes allant d'une simple sensation de démangeaison et de gêne ORL et/ou oculaire jusqu'à des atteintes bien plus sévères qui ont été précédemment décrites (kératite, bronchorrhée, bronchospasme). Dans un tel tableau clinique irritatif, il est possible que l'atteinte de la muqueuse nasale puisse progresser jusqu'à une épistaxis (saignements de nez). Jusqu'ici, un tel signe ne paraît pas avoir été rapporté de façon claire dans le toxidrome de l'exposition à *Ostreopsis* ou à ses toxines. Il ne faut cependant pas exclure un tel signe en cas de lésion de la tache vasculaire qui pourrait survenir en cas d'exposition massive. Néanmoins, une telle exposition massive implique toujours des signes et symptômes bien patents d'atteinte des autres muqueuses bien plus exposées et plus sensibles. Ainsi, les cas rapportés d'épistaxis isolées lors de proliférations d'*Ostreopsis* sans aucun autre signe clinique irritatif atteignant la totalité de la sphère ORL et oculaire, ne peuvent être, selon nous, considérés comme imputables à la microalgue et ses toxines associées.

2.6.3 La maladie de Haff

Selon l'encyclopédie médico-chirurgicale (de Haro, 2021), la maladie de Haff est observée après l'ingestion de poissons d'eaux douces des lacs et étangs ou d'espèces marines pêchées dans des eaux stagnantes et/ou saumâtres. Ce type d'intoxication, qui se développe sous forme de clusters, a été décrit pour la première fois en 1924 dans l'ancienne ville prussienne de Königsberg après ingestion de lottes (genre *Lota*) et d'anguilles (genre *Anguilla*) pêchées dans la lagune de la Vistule sur la mer Baltique (lagune qui porte le nom de « Haff » en allemand, d'où le nom de la pathologie) (Bucholz *et al.*, 2000 ; de Haro, 2021). Si cette intoxication fut au vingtième siècle essentiellement rapportée en Pologne, en Suède et en Russie (Bucholz *et al.*, 2000), les publications les plus récentes ne sont plus européennes mais américaines avec plusieurs cas colligés aux Etats-Unis et au Canada avec le poisson buffle *Ictiobus cyprinellus* des Grands Lacs d'Amérique du Nord ou après ingestion de saumon sauvage (Langley *et al.*, 2007), mais aussi asiatiques avec des publications qui font état d'un véritable phénomène émergent en Chine depuis le début des années 2000 (Chan, 2016) après la consommation de poissons d'eaux douces non identifiés, mais surtout après l'ingestion de plusieurs espèces de deux familles d'écrevisses (*Astacidés* et *Cambaridés*) d'eaux douces

(Guo *et al.*, 2019 ; Huang *et al.*, 2019). Le tableau clinique est caractérisé par une atteinte musculaire importante avec faiblesse, myalgies intenses et rhabdomyolyse massive induisant de multiples complications pouvant rapidement mettre en jeu le pronostic vital : myoglobinurie, élévation des créatines kinases, insuffisance rénale, hyperkaliémie, acidose et troubles du rythme cardiaque. Le traitement consiste, en début d'intoxication, à maintenir la fonction rénale avec des apports hydro-électrolytiques. En cas d'insuffisance rénale patente, plusieurs patients de clusters russes ont bénéficié d'épuration extra rénale. Depuis peu, le Brésil semble être aussi concerné, avec des publications rapportant des cas similaires en Amazonie avec plusieurs espèces de poissons d'eau douce appelés localement « Pacu » des genres *Mylossoma* et *Colossoma* (Dos Santos *et al.*, 2009). Dans ce pays d'Amérique latine au climat équatorial, nous sommes bien loin de la définition initiale de la maladie de Haff qui semblait être limitée aux eaux froides, douces ou saumâtres (Bucholz, 2000). La situation semble encore plus complexe depuis la parution d'une publication récente brésilienne qui fait le lien entre ce que les auteurs appellent des cas de « Maladie de Haff » et la PLTX. Ainsi, Cardoso *et al.* (2022) rapporte principalement deux clusters : 65 observations colligées de façon rétrospective dans l'état de Bahia entre 2016 et 2017 après ingestion de poissons marins, puis 16 observations, dont un décès, colligées de façon prospective dans le même état entre 2020 et 2021, toujours après ingestion de poissons marins (principalement des genres *Seriola* et *Mycteroperca* aux appellations vernaculaires locales respectives de « olho de boi » et « badejo »). Dans des restes de repas contenant de la chair de poisson, les auteurs soulignent n'avoir trouvé aucune trace de ciguatoxine, aucune concentration élevée de métaux lourds, mais pour deux échantillons de chair cuite de sériole, des traces de toxines du groupe de la PLTX ont été mises en évidence (les auteurs évoquent les ovatoxines OVTX-a, OVTX-b et OVTX-d, et isob-PLTX). Pour plusieurs autres échantillons de repas ayant induit des intoxications humaines, aucune trace de toxines appartenant au groupe de la PLTX n'a été retrouvée. Les auteurs ajoutent qu'aucune efflorescence de cyanobactéries et qu'aucun pic de cyanotoxines dans les eaux de cet état brésilien aux alentours de la ville de Salvador n'ont été retrouvées lors de ces clusters d'intoxications. L'hypothèse d'un rôle des toxines PLTX-like dans la « maladie de Haff » est donc proposée dans la discussion de cet article. Cette hypothèse est sujette à discussion : tout d'abord, les circonstances des intoxications décrites dans ce travail ne correspondent pas à la définition de la véritable « Maladie de Haff ». Il est en effet difficile de réunir dans le même toxidrome des intoxications induites par l'ingestion de poissons vivant dans des biotopes si éloignés. Il paraît en effet peu probable que les mêmes toxines puissent contaminer d'une part des poissons d'eaux douces ou saumâtres glaciales de Russie, de Scandinavie ou du Canada et d'autre part des poissons marins pélagiques des eaux équatoriales le long de l'état de Bahia, à moins que des microorganismes producteurs totalement différents produisent la même famille de toxines. L'étude du tableau clinique présenté par les patients dans cet article permet de comprendre la physiopathologie des intoxications observées au Brésil en montrant que le *primum movens* est indiscutablement une myotoxicité allant de la simple myalgie à une rhabdomyolyse majeure. Lorsque la lyse des cellules musculaires est massive, cela induit de multiples complications dont une myoglobinurie néphrotoxique expliquant les cas d'insuffisance rénale et une hyperkaliémie brutale expliquant les troubles de rythme cardiaque. Notons que les auteurs brésiliens rapportent que les muscles les plus atteints sont les trapèzes (notion nouvelle) et qu'un tiers environ des patients présentent la sensation de bouche sèche (sans mentionner la notion de dysgueisie). Du point de vue purement clinique, ce tableau décrit au Brésil est similaire aux observations classiques de « maladie de Haff » des eaux douces froides, avec une cible toxique musculaire, ce qui peut expliquer le choix de l'étiquette syndromique choisie par les

auteurs (choix discutable du point de vue des circonstances, mais peut-être pas du point de vue des toxines responsables). Toujours du point de vue clinique, il existe une nette différence entre ces clusters brésiliens et les rares observations de « Palytoxicose » ou de « Clupeotoxisme » qui historiquement sont considérés comme des intoxications par ingestion de poissons / crustacés contaminés par la PLTX ou toxines apparentées : dans ces intoxications l'atteinte organique ne se limite pas aux muscles : il s'agit d'une atteinte multiviscérale brutale avec en quelques heures voire en quelques minutes, une atteinte musculaire (myalgies, rhabdomyolyse) mais aussi rénale directe (anurie, insuffisance rénale) mais surtout neurologique (convulsions, voire état de mal épileptique), d'où l'hypothèse émise très rapidement d'une vasoconstriction induisant une atteinte anoxique poly-organique. Du point de vue chronologique, il est impossible qu'une myotoxicité, aussi puissante soit-elle, puisse induire en si peu de temps une défaillance multiviscérale comme celle observée lors des cas de « Palytoxicose » ou de « Clupéotoxisme ». En résumé, cet article brésilien, rapporte des cas d'intoxication après ingestion de poissons marins avec un tableau clinique initial de myotoxicité potentiellement grave. Un tel tableau évoque un autre type d'intoxication appelé « Maladie de Haff » qui est observée après ingestion de poissons / crustacés des eaux froides douces ou saumâtres. Ce tableau est différent du point de vue physiopathologique des tableaux historiques survenus après ingestion de poissons / crustacés des eaux marines tropicales contaminés par la PLTX ou ses toxines associées et autrefois appelées « Palytoxicose » et « Clupéotoxisme ». Ainsi, faire le lien entre la découverte de traces d'ovatoxines dans les restes de deux repas (et pas dans les restes des autres repas concernés) et la genèse de ces clusters paraît pour l'instant très prématuré.

2.7 Points à retenir

- Dès les années 1970, des intoxications humaines graves et parfois mortelles ont été rapportées en milieu tropical après ingestion de produit de la mer : soit des crabes ou des poissons perroquets au niveau des côtes asiatiques de l'Océan Pacifique, soit des poissons planctonophages pélagiques dans les océans Indien et Pacifiques. Dès 1987, le rôle de la palytoxine dans la genèse de ces intoxications aux tableaux cliniques similaires est évoqué à partir de travaux japonais.
- Dès 2008, des intoxications d'aquariophiles par de la palytoxine produite par des coraux mous ont été rapportées d'abord aux Etats-Unis, puis dans toute l'Europe, y compris en France. Les patients sont intoxiqués à domicile par inhalation de microgouttelettes contaminées par des toxines libérées à la mort d'un spécimen de corail mou. Les signes respiratoires et oculaires observés peuvent être particulièrement graves dans ces circonstances car les quantités de toxines libérées sont parfois élevées.
- Les algues unicellulaires du genre *Ostreopsis*, productrices d'analogues de la palytoxine, ont été observées en Méditerranée dès la fin des années 1990 et les premiers cas d'intoxications humaines après inhalation (et non ingestion) ont été rapportés en Italie en 1998. Depuis, ce pays est le plus concerné par les proliférations d'*Ostreopsis*, ce qui explique que les plus importants clusters de patients y aient été observés. Cependant, d'autres pays du pourtour méditerranéen sont également touchés : l'Espagne, la France, Monaco, l'Algérie, mais aussi le Sénégal sur la côte atlantique de l'Afrique.

- En France, des intoxications humaines ont été colligées entre Menton et Marseille dès l'année 2006. Plusieurs proliférations importantes en Méditerranée ont depuis cette date été à l'origine de mesures de protection de la population, telles que la fermeture de plage.
- Au cours de l'été 2021 au niveau de la côte basque française, plusieurs centaines de baigneurs ou riverains ont présenté un tableau clinique équivalent au toxidrome irritatif et inflammatoire rapporté en Méditerranée. La présence confirmée de grandes quantités de cellules d'*Ostreopsis* dans l'eau de mer a permis de constater que le phénomène déjà connu en Méditerranée s'était étendu à la côte atlantique, et ce avec un impact en santé publique plus important (plusieurs centaines de patients en Atlantique *versus* quelques dizaines en Méditerranée). Des intoxications non validées médicalement auraient en fait été observées dès l'été 2020. Au cours de l'été 2022, les structures médicales impliquées (Centre Antipoison de Bordeaux, ARS Aquitaine, Hôpitaux locaux) ont confirmé que de nombreux patients ont aussi été intoxiqués.
- La sensation de goût métallique peut être considérée comme le seul symptôme spécifique mais non systématique d'une exposition à *Ostreopsis*.

3 Diversité et biogéographie des espèces du genre *Ostreopsis*

Ostreopsis est une microalgue unicellulaire appartenant à la classe des *Dinophyceae* (Dinoflagellés). La structure de base de ce groupe ainsi que les noms des différentes parties de ces organismes sont présentés dans la Figure 2.

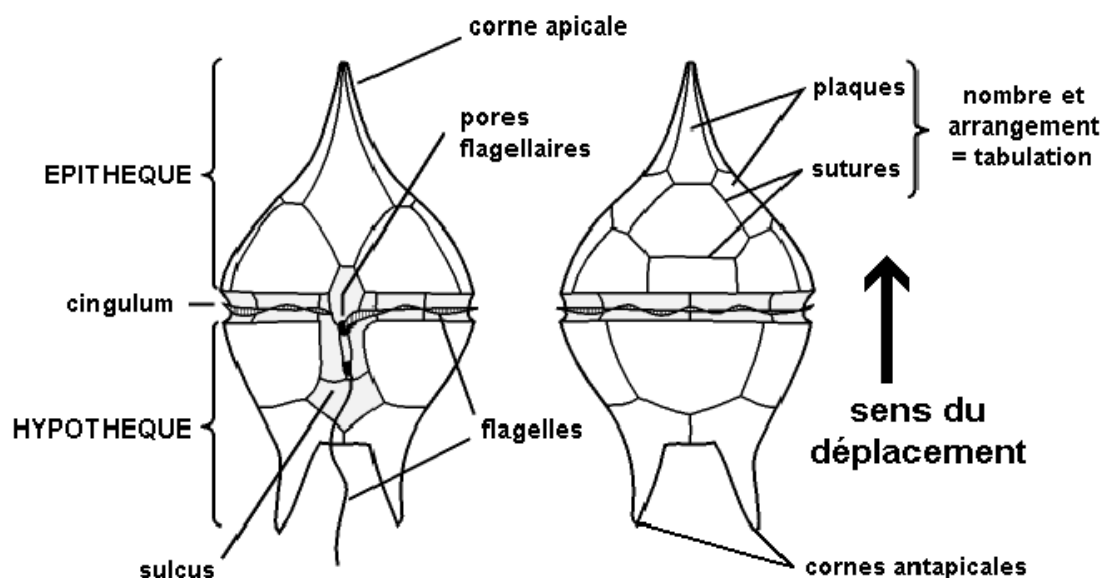


Figure 2 : Morphologie des dinoflagellés - Face ventrale (gauche) - Face dorsale (droite)

(Source :Queguiner, 2009)

Les dinoflagellés sont dotés de deux flagelles logés chacun dans un sillon. Le flagelle transversal (souvent en position équatoriale au niveau de la cellule) est logé dans le *cingulum*. Le début de l'autre flagelle, qui est perpendiculaire au premier, est logé dans un autre sillon, nommé *sulcus*. La partie de la cellule au-dessus du *cingulum*, qui ne comporte pas le *sulcus*, est nommée épithèque. La partie de la cellule en dessous du *cingulum*, qui comporte le *sulcus*, est nommée hypothèque. Par convention, la face qui comporte le *sulcus* est la face ventrale (la partie opposée est la face dorsale).

La paroi des dinoflagellés est souvent formée de plaques, limitées par des sutures. Le nombre et l'arrangement de ces plaques (nommé Tabulation) est utilisé dans la détermination de certaines espèces de dinoflagellés. La première série de plaques (on commence toujours à les compter depuis le haut de l'épithèque, en allant vers le bas de l'hypothèque) est notée par une apostrophe « ' ». Ainsi, 3' signifie qu'il existe trois plaques dans la première série, qui fait le tour de la cellule. La deuxième série est notée avec une double apostrophe « '' », et ainsi de suite. Les plaques du *cingulum* et du *sulcus* sont également importantes pour la détermination des genres ou des espèces et sont suivies des lettres « c » et « s ». Les plaques au niveau des sillons peuvent également avoir des noms particuliers (comme Sda, pour la plaque sulcale antérieure droite ; Ssa, pour la plaque sulcale antérieure gauche ; Sp, pour la plaque sulcale supérieure). Il existe également des pores au niveau de la thèque, notés P

dans la Tabulation (ex : Po est un pore dans la partie antérieure de l'épithèque, intégré dans une zone nommée APC -Apical Pore Complex). Certains dinoflagellés possèdent des cornes, d'autres n'en possèdent pas.

Les espèces du genre *Ostreopsis* ont plusieurs caractéristiques partagées : l'épithèque et l'hypothèque sont beaucoup plus larges que hautes et il n'y a pas de cornes. De plus, le *sulcus* est très petit et formé de plaques difficiles à observer.

3.1 Description des espèces du genre *Ostreopsis*

Ostreopsis Jhos. Schmidt 1901, est un genre de *Dinophyceae* (dinoflagellés) de la famille des *Pyrocystaceae*. Les cellules du genre *Ostreopsis* sont reconnaissables à leur forme dite en « goutte » (Hasle et Tomas, 1996) : elles sont ovoïdes et comprimées antéro-postérieurement (Faust et Gullledge, 2002). La tabulation (l'organisation des plaques au niveau de la thèque) a évolué selon les auteurs (Accoroni et Totti, 2016), mais un accord sur la nomenclature des plaques semble se dessiner avec la formule suivante : Po, 3', 7", 6c, 7s, 5"', 2'''''. Si cette formule semble commune à toutes les espèces du genre, l'orientation et la forme des plaques peuvent être des critères de détermination spécifiques, tout comme la taille (longueur, largeur et épaisseur) des cellules. Néanmoins, certaines espèces ne peuvent pas être discriminées en microscopie optique, les tailles des cellules ainsi que la forme des plaques étant très proches.

Ostreopsis siamensis a été la première espèce décrite dans le Golfe de Siam (Thaïlande) par Schmidt en 1901 (Figure 3).

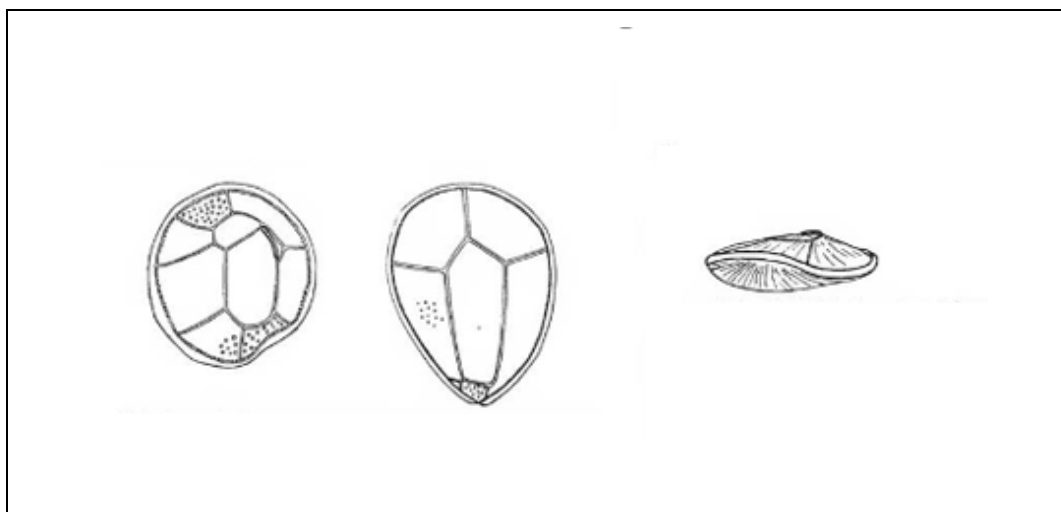


Figure 3 : Illustration originale d'*Ostreopsis siamensis* décrite par Schmidt 1901 dans le Golfe de Siam (épithèque à gauche, hypothèque au milieu, vue latérale à droite)

Selon le registre mondial des espèces marines³, onze espèces du genre *Ostreopsis* ont été décrites (Figure 4 à Figure 6) :

- *Ostreopsis belizeana* (Faust, 1999) ;
- *Ostreopsis caribbeana* (Faust, 1999) ;
- *Ostreopsis fattorussoi* (Accoroni *et al.*, 2016a) ;
- *Ostreopsis heptagona* (Norris et Balech, 1985) ;

³ <https://www.marinespecies.org/> consulté le 18 avril 2022

- *Ostreopsis labens* (Faust, 1995) ;
- *Ostreopsis lenticularis* (Fukuyo, 1981) ;
- *Ostreopsis marina* (Faust, 1999) ;
- *Ostreopsis mascarenensis* (Quod, 1994) ;
- *Ostreopsis ovata* (Fukuyo, 1981) ;
- *Ostreopsis rhodesiae* (Verma *et al.*, 2016) ;
- *Ostreopsis siamensis* (Schmidt, 1901).

Remarque : L'espèce *Ostreopsis monotis* décrite par Lindemann (1928) comme faisant partie du genre *Ostreopsis* est désormais classifiée dans un autre genre en tant que *Coolia monotis*, comme dans la description originale de Meunier (1919).

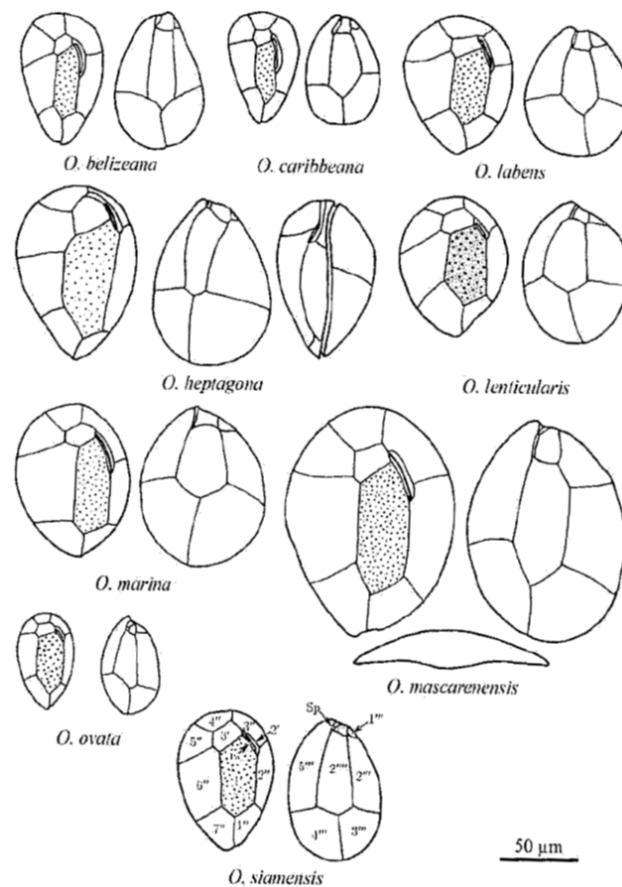


Figure 4 : Représentation des espèces du genre *Ostreopsis* décrites avant 2014, avec la limite des plaques sur des thèques

Les espèces sont à l'échelle (voir la barre en bas à droite). Pour chaque espèce, l'épithèque est à gauche et l'hypothèque est à droite.

(Source : Hoppenrath *et al.*, 2014)

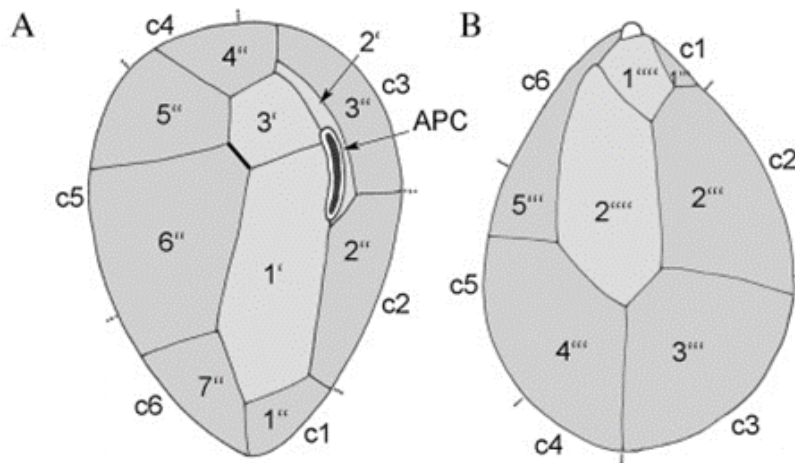


Figure 5 : Représentation d'*Ostreopsis rhodesiae* et d'*Ostreopsis heptagona*, avec les limites et la numérotation des plaques (tabulation). A : Epithèque, B : Hypothèque

(Source Verma *et al.*,2016)

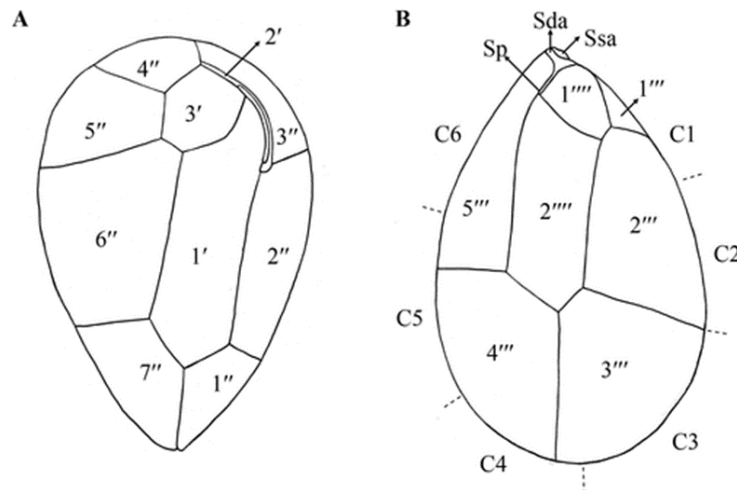


Figure 6 : Représentation d'*Ostreopsis fattorussoi* avec les limites et la numérotation des plaques (tabulation). (A) epithèque, (B) hypothèque et cingulum. Sda, plaque sulcale antérieure droite ; Ssa, plaque sulcale antérieure gauche ; Sp, plaque sulcale supérieure

(Source Accoroni *et al.*,2016a)

Une douzième espèce vient très récemment d'être décrite (Verma *et al.*, 2023). Il s'agit d'*Ostreopsis tairoto* sp. nov. qui était précédemment reportée comme étant *Ostreopsis* sp. 3 et qui se trouve dans les îles Cook (dans le Sud-Ouest du Pacifique). Elle est proche phylogénétiquement d'*O. mascarensis*, d'*O. fattorussoi*, d'*O. rhodesiae* et d'*O. cf. siamensis*. Cette nouvelle espèce était considérée auparavant comme faisant partie du complexe *O. cf. ovata*, mais elle s'en distingue principalement par la présence de petits pores. *Ostreopsis tairoto* n'est pas encore intégrée dans le registre mondial des espèces marines⁴.

⁴ <https://www.marinespecies.org/> consulté le 22 avril 2023

3.2 Phylogénie des espèces du genre *Ostreopsis*

La proximité morphologique de certaines espèces du genre *Ostreopsis*, associée à la variabilité morphologique au sein d'une même espèce, compliquent les études et rendent l'identification génétique indispensable (Chomérat *et al.*, 2020a). Les différents clades moléculaires ont souvent été associés à des distributions géographiques spécifiques, ce qui renforce l'idée d'une distribution cryptique du genre *Ostreopsis* à travers le globe. Par exemple, l'holotype (c'est-à-dire le spécimen type ayant permis de définir et décrire une catégorie déterminée dans la classification des organismes vivants) d'*Ostreopsis siamensis* (Schmidt 1901), observé dans le Golfe de Siam, avait seulement été décrit morphologiquement, mais n'avait jamais été caractérisé génétiquement. Des souches isolées dans différentes régions du globe avaient été initialement associées à l'espèce *O. siamensis* parce qu'elle lui correspondait morphologiquement (Faust, Morton et Quod, 1996; Rhodes, 2011). Elles ont depuis été renommées « *O. cf. siamensis* » en raison de leurs divergences génétiques avec des souches isolées récemment dans des régions proches du Golfe de Siam, correspondant morphologiquement à *O. siamensis* et génétiquement caractérisées (Tawong *et al.*, 2014 ; Chomérat *et al.*, 2020b).

Pour *O. ovata*, l'historique de la nomenclature est proche de celle d'*O. siamensis*. L'analyse génétique de l'holotype n'ayant pas encore été publiée (la localité type est une île de l'archipel de Ryukyu en Mer de Chine orientale, proche de Taïwan), les souches qui sont morphologiquement proches d'*O. ovata* sont nommées *O. cf. ovata*, sans qu'il soit possible, en l'état actuel des connaissances, de savoir si ces souches sont de véritables *O. ovata* ou si elles appartiennent à une ou des espèces très proches morphologiquement (espèces cryptiques).

L'analyse des séquences de l'ADN ribosomique (rDNA) sont utilisées pour discriminer les espèces du genre *Ostreopsis* (Lee et Park, 2020; Penna *et al.*, 2010; Sato *et al.*, 2011; Tawong *et al.*, 2014) mais la correspondance entre les génotypes et les morphotypes n'est pas toujours facile, les données morphologiques étant manquantes ou pas assez détaillées (Chomérat *et al.*, 2020b; Sato *et al.*, 2011). La taxonomie du genre *Ostreopsis* requiert par conséquent une révision majeure.

L'ADN ribosomique (rDNA) comporte plusieurs domaines, comme la LSU (Large Subunit ; grande sous-unité), la SSU (Small Subunit, petite sous-unité) et l'ITS (Internal Transcribed Spacer, l'espaceur interne transcrit). Les domaines LSU (domaines D1-D3 et/ou D8-D10) ainsi que les ITS présentent suffisamment de polymorphisme pour discriminer les espèces du genre *Ostreopsis*. Il est cependant difficile d'avoir une vision intégrée de la phylogénie de ces taxa car les données moléculaires disponibles pour chacune des espèces décrites sont très hétérogènes, certaines d'entre elles n'ayant qu'un domaine séquencé, alors que d'autres, beaucoup plus rares, ont leurs trois domaines séquencés.

Il existe ainsi un arbre phylogénique basé sur les distances génétiques des domaines D1-D3 du LSU (Figure 7), un arbre basé sur les distances génétiques des domaines D8-D10 du LSU (Figure 8), un autre basé sur les distances génétiques des domaines ITS1-5.8S-ITS2 (Figure 9). Pour quelques rares espèces très bien étudiées, il existe un arbre phylogénique basé sur les distances de l'ensemble des domaines (SSU, LSU et ITS ; Figure 10).

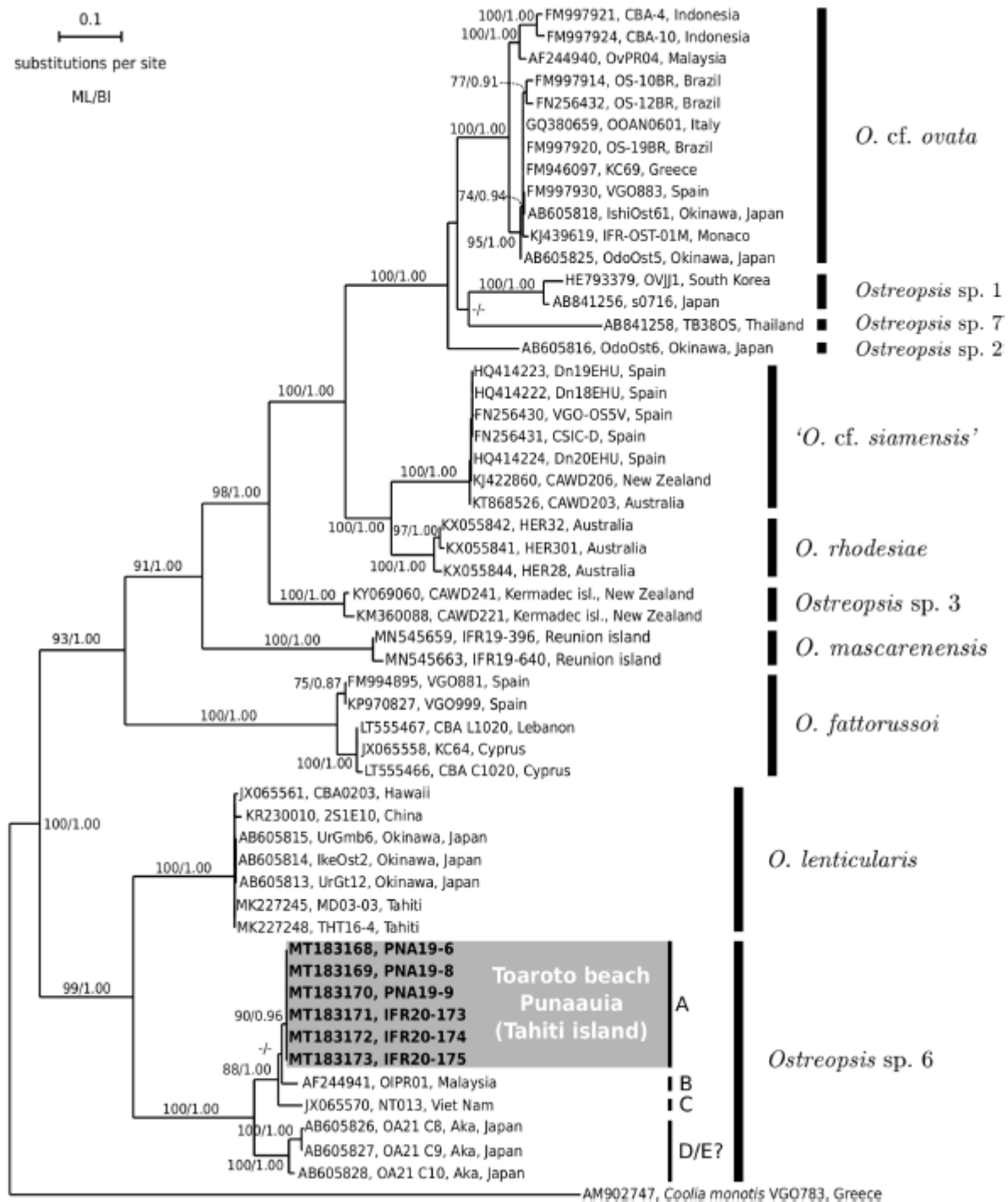


Figure 7 : Arbre phylogénétique à vraisemblance maximale construit à partir des séquences D1–D3 de l'ADNr LSU de diverses espèces d'*Ostreopsis*. D'après Chomérat *et al.* (2020b)

Coolia monotis est utilisé comme groupe externe. Les barres verticales noires désignent les différents clades d'*Ostreopsis*. Les numéros aux nœuds représentent les valeurs de bootstrap du maximum de vraisemblance (ML) et les probabilités postérieures de l'inférence bayésienne (BI). Les valeurs de bootstrap inférieures à 65 et les probabilités postérieures < 0,70 sont indiquées par "-". La partie grisée fait ressortir les souches du Pacifique.

(Source Chomérat *et al.*, 2020b)

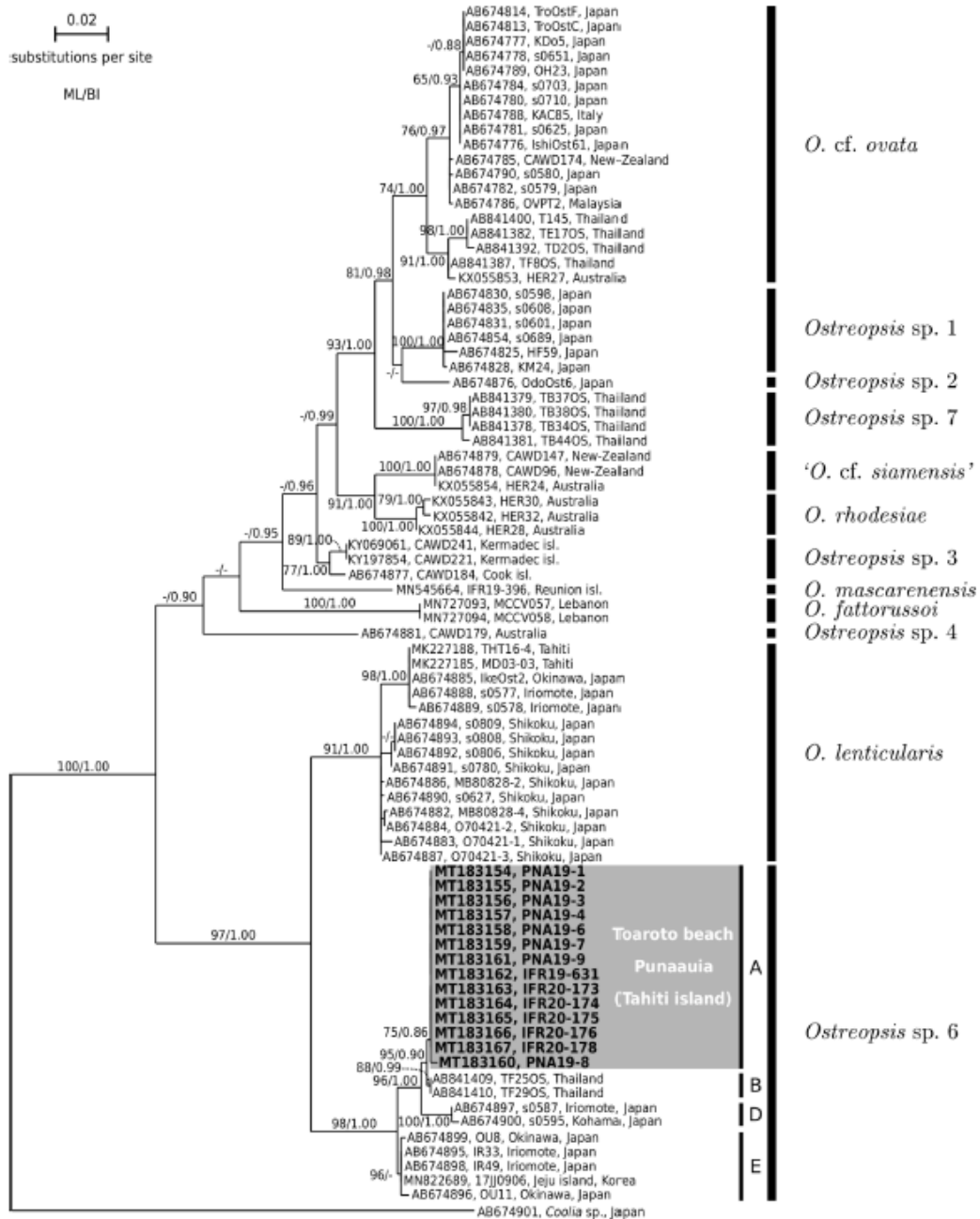


Figure 8 : Arbre phylogénétique à vraisemblance maximale construit à partir des séquences d'ADNr LSU D8 – D10 de diverses espèces d'*Ostreopsis*

Coolia sp. est utilisé comme groupe externe. Les barres verticales noires désignent les différents clades d'*Ostreopsis*. Les nombres aux nœuds représentent les valeurs de bootstrap du maximum de vraisemblance (ML) et les probabilités *a posteriori* de l'inférence bayésienne (BI). Les valeurs de bootstrap inférieures à 65 et les probabilités postérieures < 0,70 sont indiquées par "-". La partie grisée fait ressortir les souches du Pacifique (Source Chomérat *et al.*, 2020b).

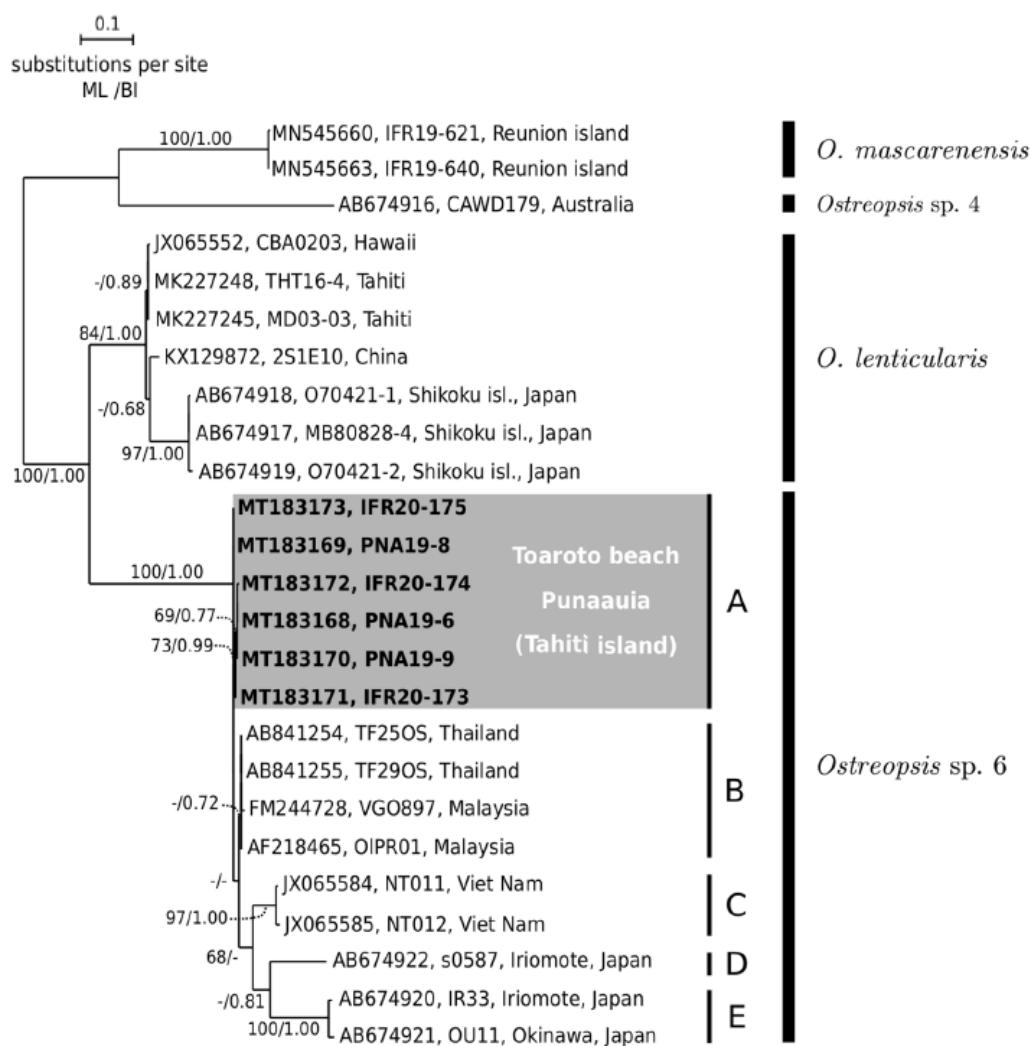


Figure 9 : Arbre phylogénétique à vraisemblance maximale construit à partir des séquences d'ADNr ITS-5.8S de diverses espèces d'*Ostreopsis*. *Ostreopsis mascarenensis* et *Ostreopsis* sp. 4 sont utilisées comme groupes externes

Les barres verticales noires désignent les différents clades d'*Ostreopsis*. Les nombres aux nœuds représentent les valeurs de bootstrap du maximum de vraisemblance (ML) et les probabilités postérieures de l'inférence bayésienne (BI). Valeurs bootstrap en dessous de 65 sont indiqués par '-'. La partie grisée fait ressortir les souches du Pacifique. (Source Chomérat *et al.*, 2020b)

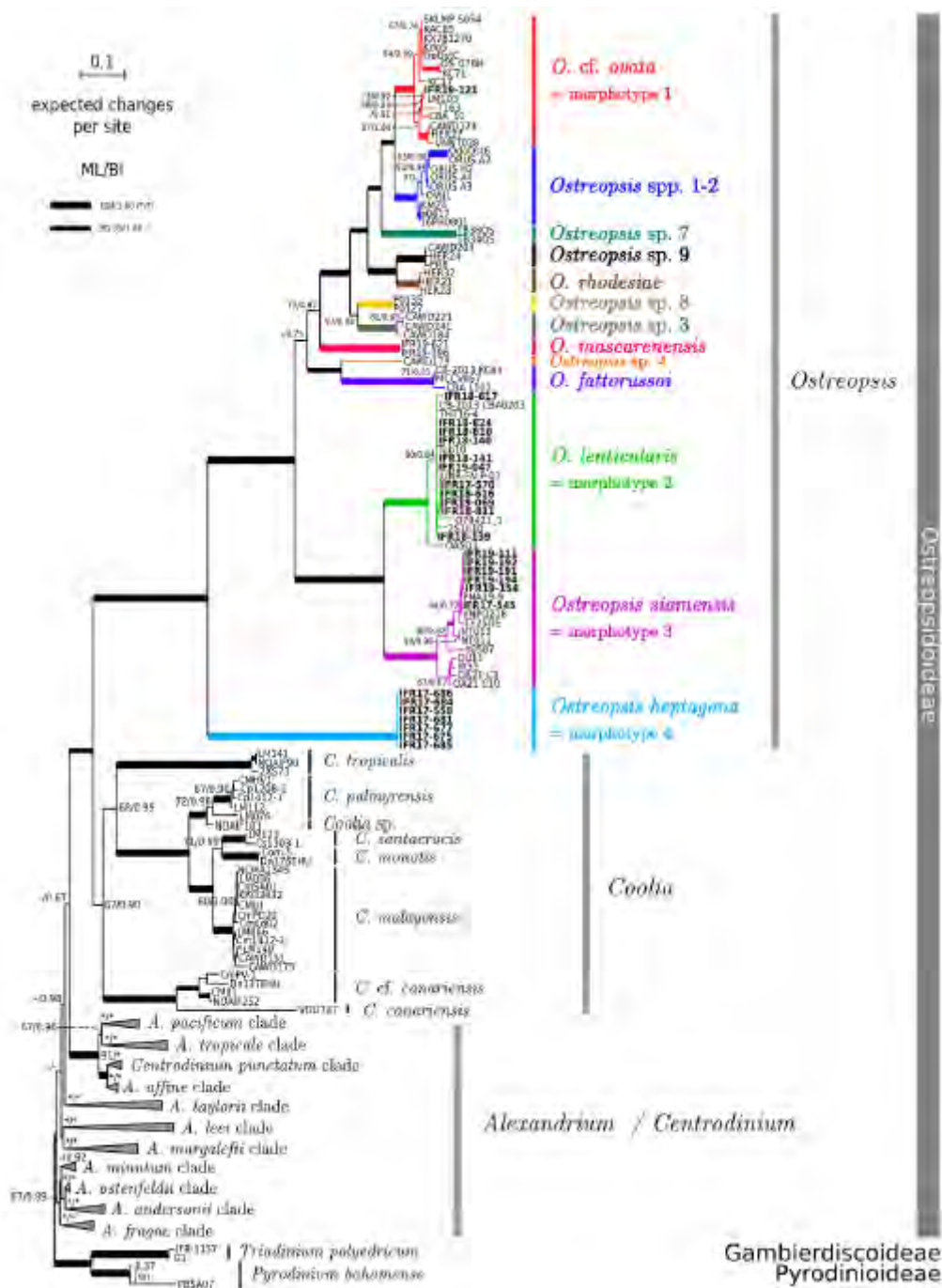


Figure 10 : Arbre phylogénétique basé sur 189 séquences concaténées d'opéron ribosomique (SSU + ITS + LSU D1-D3 et D8-D10) (6 382 paires de bases alignées) de différentes souches d'*Ostreopsidoideae* et d'autres *Gonyaulacales* en tant que groupes externes

Les sous-clades *Alexandrium / Centrodinium* sont réduits pour plus de lisibilité. La robustesse des branches a été indiquée par les valeurs de bootstrap (ML) et les probabilités a posteriori (BI). Les valeurs de bootstrap inférieures à 65 et les probabilités postérieures < 0,9 sont indiquées par '-'. A droite, des barres verticales délimitent les principaux clades correspondant aux différentes espèces/génotypes. Les séquences acquises dans l'étude de Boisnoir *et al.* (2022) et provenant des Antilles françaises sont indiquées en caractères gras (morphotypes 1 à 4).

L'analyse des différentes études présentées ci-dessus permet de faire le bilan suivant pour les espèces du genre *Ostreopsis* :

- neuf espèces ont été décrites morphologiquement et génétiquement: *O. fattorussoi*, *O. heptagona*, *O. lenticularis*, *O. mascarenensis*, *O. rhodesiae*, *O. siamensis*, ainsi que *O. cf. ovata*, *O. cf. siamensis* et *O. tairoto* ;
- cinq espèces ne sont décrites que morphologiquement : *O. belizeana*, *O. caribbeana*, *O. labens*, *O. marina* et *O. ovata* ;
- il existe, à ce jour, huit ribotypes⁵ (*Ostreopsis* sp. 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 et 9) qui ne sont associés à aucun morphotype⁶, ce qui démontre que ce genre contient des espèces cryptiques (espèces qui ne sont pas morphologiquement différentes et qui ne peuvent donc être identifiées que génétiquement); (pour information, le ribotype *Ostreopsis* sp. 5 a été associé à l'espèce *O. lenticularis* par Chomérat *et al.* (2019)) ;
- *Ostreopsis cf. siamensis* est une espèce différente de *O. siamensis* ;
- *Ostreopsis cf. ovata* n'est peut-être pas la même espèce que *O. ovata* (mais il manque le génotypage de spécimens de la localité d'origine pour pouvoir conclure). Il s'agit peut-être d'un complexe d'espèces puisqu'en travaillant avec les régions 5.8S et ITS de l'ADNr, trois clades se distinguent chez *O. cf. ovata* (Carnicer *et al.*, 2016) : un clade Atlantique/Indien/Pacifique, un autre Indien/Pacifique et enfin un Atlantique/Méditerranée/Pacifique (Figure 11).

⁵ Ribotype : empreinte spécifique d'une espèce définie par une ou plusieurs séquences des ARN ribosomiques¶

⁶ Morphotype : type morphologique (ou morphologie standard), décrivant la forme copurante et classique d'une espèce ;

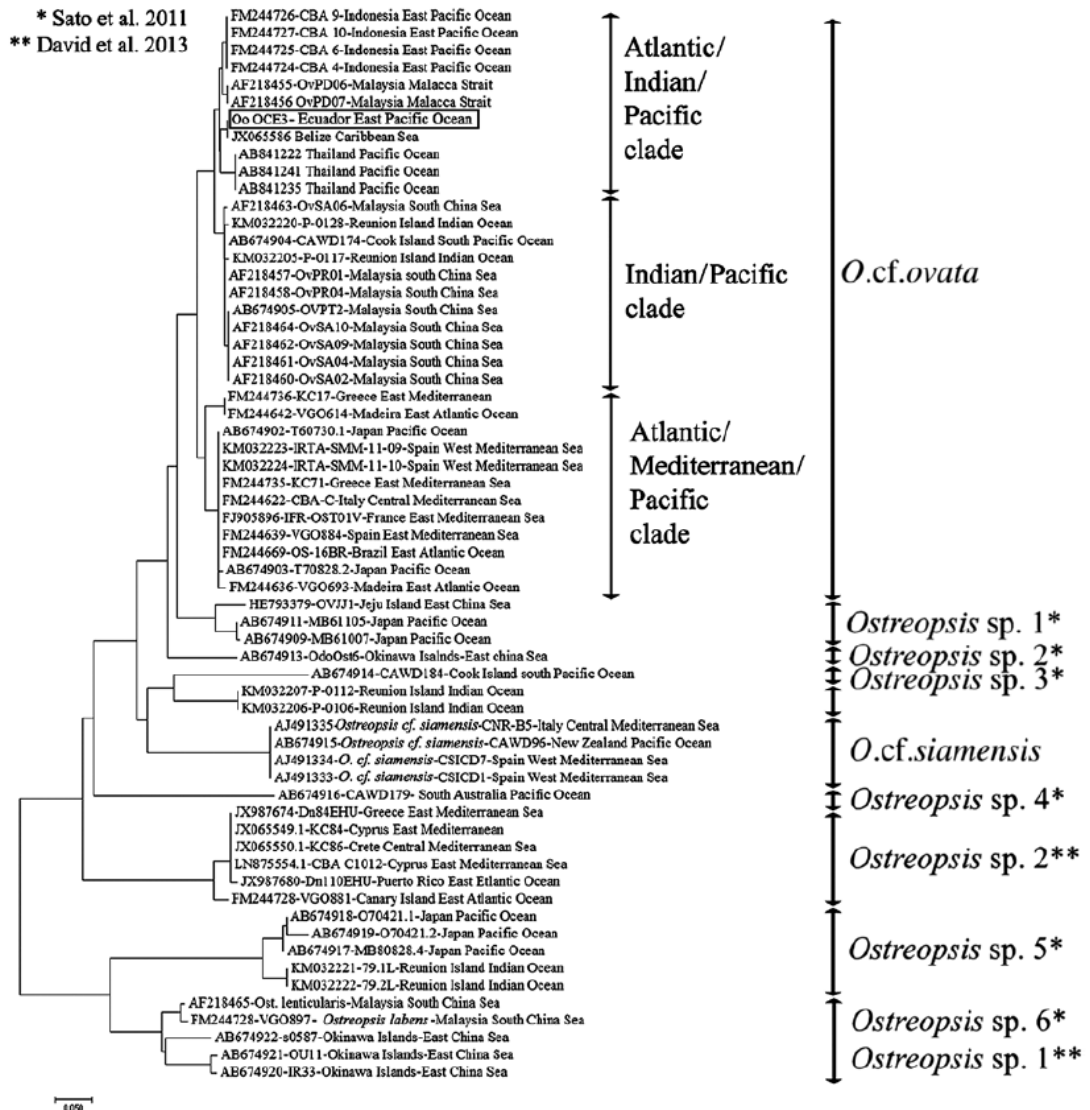


Figure 11 : Arbre phylogénétique des espèces d'*Ostreopsis*, basé sur les ITS et le 5.8S

(Source Carnicer *et al.*, 2016)

3.3 Biogéographie

3.3.1 Distribution mondiale

Les espèces d'*Ostreopsis* ont longtemps été décrites comme étant pantropicales, c'est-à-dire distribuées dans les zones tropicales et subtropicales de chaque hémisphère. Cependant, depuis plusieurs décennies, la présence d'*Ostreopsis* spp. a été régulièrement observée au-delà de ces zones, dans les régions tempérées des deux hémisphères (Drouet *et al.*, 2021; Rhodes, 2011).

La répartition actuelle connue du genre *Ostreopsis* est donc relativement large à l'échelle du globe (Figure 12). Concernant les zones tropicales, les espèces du genre *Ostreopsis* sont présentes aussi bien dans les zones tropicales d'Asie du sud-est (Pin *et al.*, 2001; Tawong *et al.*, 2014) que dans l'océan Indien (Chomérat *et al.*, 2020b), dans la mer des Caraïbes

(Boisnoir *et al.*, 2018) et sur les côtes atlantiques d'Amérique du sud (Nascimento *et al.*, 2012-). Au niveau des régions tempérées, des proliférations d'*Ostreopsis* sont observées en mer du Japon (Sato *et al.*, 2011; Selina *et al.*, 2014), en Océanie (Chomérat *et al.*, 2019; Shears et Ross, 2009), en mer Méditerranée (Illoul *et al.*, 2012 ; Mangialajo *et al.*, 2011 ; Totti *et al.* 2010) et depuis peu sur la côte atlantique en France, Espagne, Portugal et Sénégal (Drouet *et al.*, 2021 ; Santos *et al.*, 2019 ; Brehmer *et al.*, 2021). Comme pour d'autres microorganismes capables de proliférer et parfois de produire des toxines, l'extension apparente de l'aire de distribution du genre *Ostreopsis* et du nombre d'évènements toxiques recensés à l'échelle du globe pourrait s'expliquer en partie par l'intérêt croissant porté sur ces microorganismes depuis une vingtaine d'années (Van Dolah, 2000). Cependant, les changements climatiques associés aux capacités importantes d'adaptation de ce genre à de nouvelles conditions environnementales constituent une hypothèse complémentaire pour expliquer les proliférations récentes des espèces du genre *Ostreopsis* dans les régions tempérées des deux hémisphères.

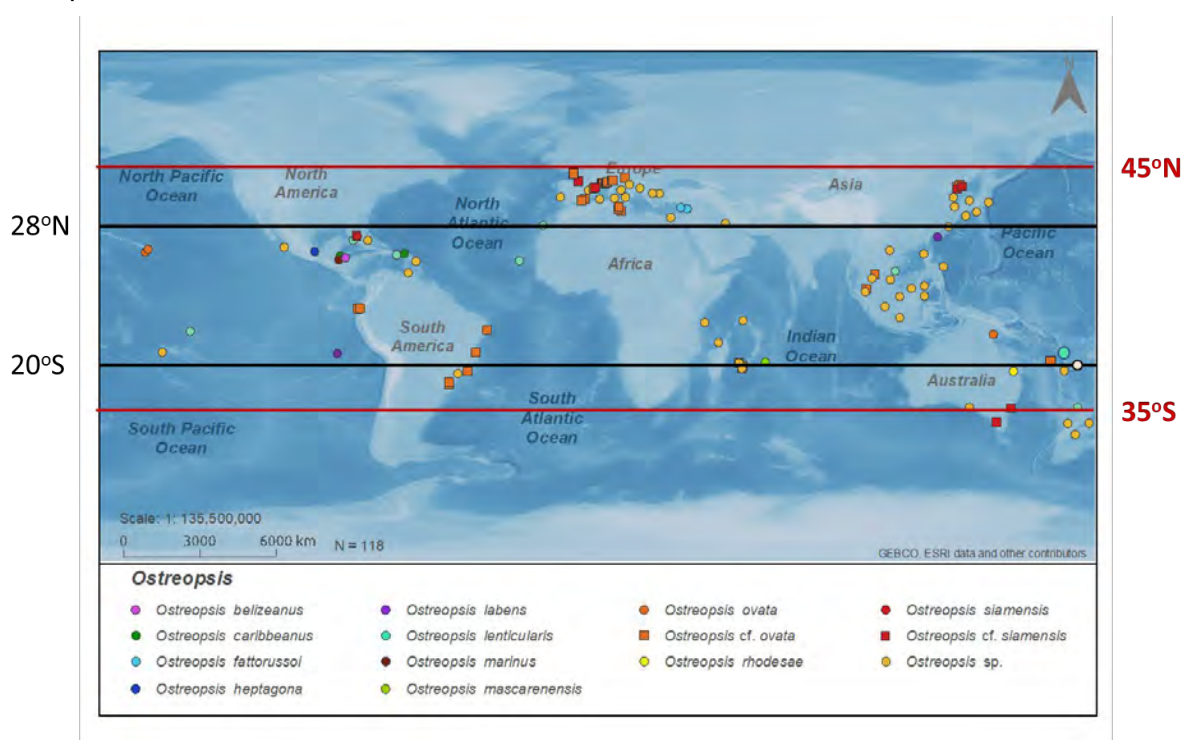


Figure 12 : Répartition mondiale des différentes espèces d'*Ostreopsis*

Il faut ajouter à cette carte (1) *O. mascarensis* à la Réunion (Chomérat *et al.*, 2020b), (2) *O. cf. ovata* et *O. sp.6* en Polynésie française (Chomérat *et al.*, 2020a), (3) *O. cf. ovata*, *O. lenticularis* et *O. siamensis* en Guadeloupe (Boisnoir *et al.*, 2022) ainsi que *O. cf. ovata* sur la côte atlantique française (Amzil *et al.*, 2021). (Boisnoir *et al.*, 2022), *O. cf. ovata* sur la côte atlantique française (Amzil *et al.*, 2021 ; Chomérat *et al.*, 2022) ainsi que *O. tairoto* aux niveau des îles Cook, Ouest Pacifique (Verma *et al.*, 2023).

(Source Tester, Litaker et Berdalet, 2020)

3.3.2 Distribution en France d'outre-mer

3.3.2.1 Antilles françaises

Concernant l'Atlantique ouest, le bilan de la biogéographie des dinoflagellés benthiques des côtes de l'Amérique latine, réalisé par Durán-Riveroll, Cembella et Okolodkov (2019), permet de disposer d'une carte de la répartition des genres, dont *Ostreopsis* (Figure 13).

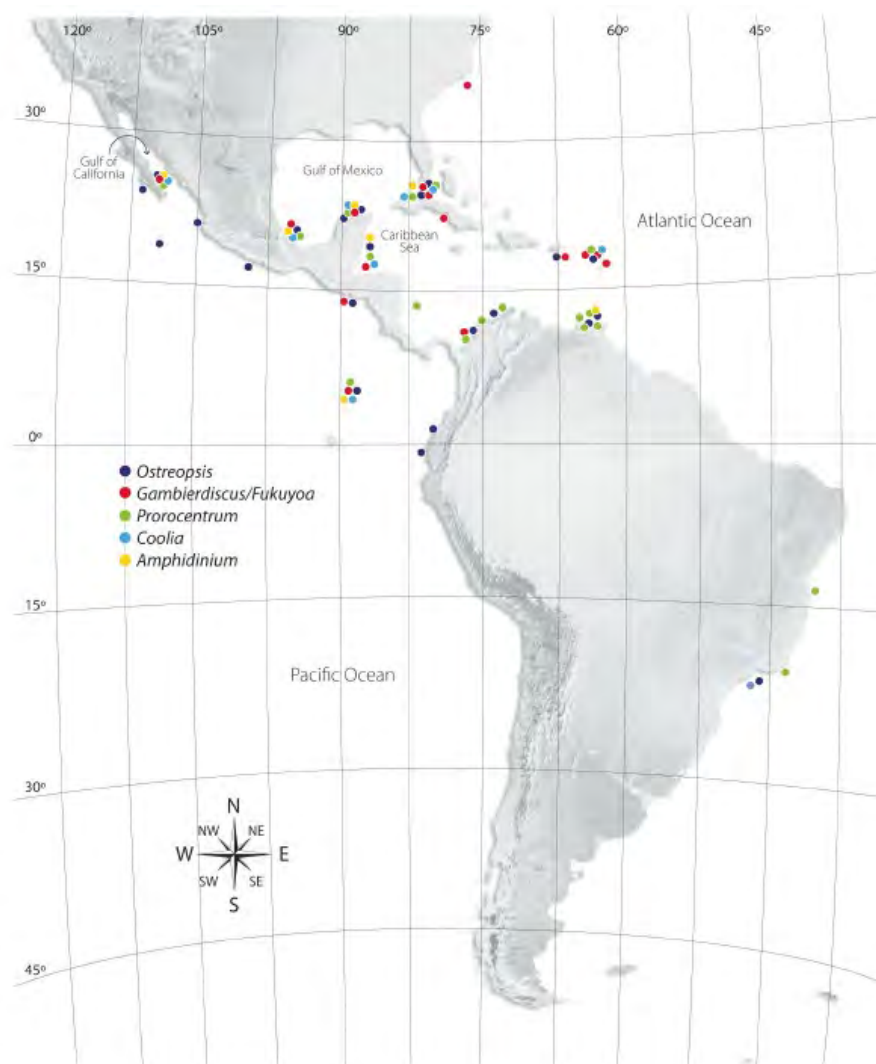


Figure 13 : Répartition connue des genres de dinoflagellés benthiques des eaux tropicales et subtropicales d'Amérique latine, ainsi que de la mer des Caraïbes et des côtes adjacentes des Amériques (Source Durán-Riveroll, Cembella et Okolodkov, 2019)

Ostreopsis est souvent le genre dominant parmi les cinq genres de dinoflagellés benthiques décrits sur les îles de la Martinique, la Guadeloupe et Saint Martin (Boisnoir *et al.*, 2020 ; Boisnoir *et al.*, 2019) (Figure 14 et Figure 15).

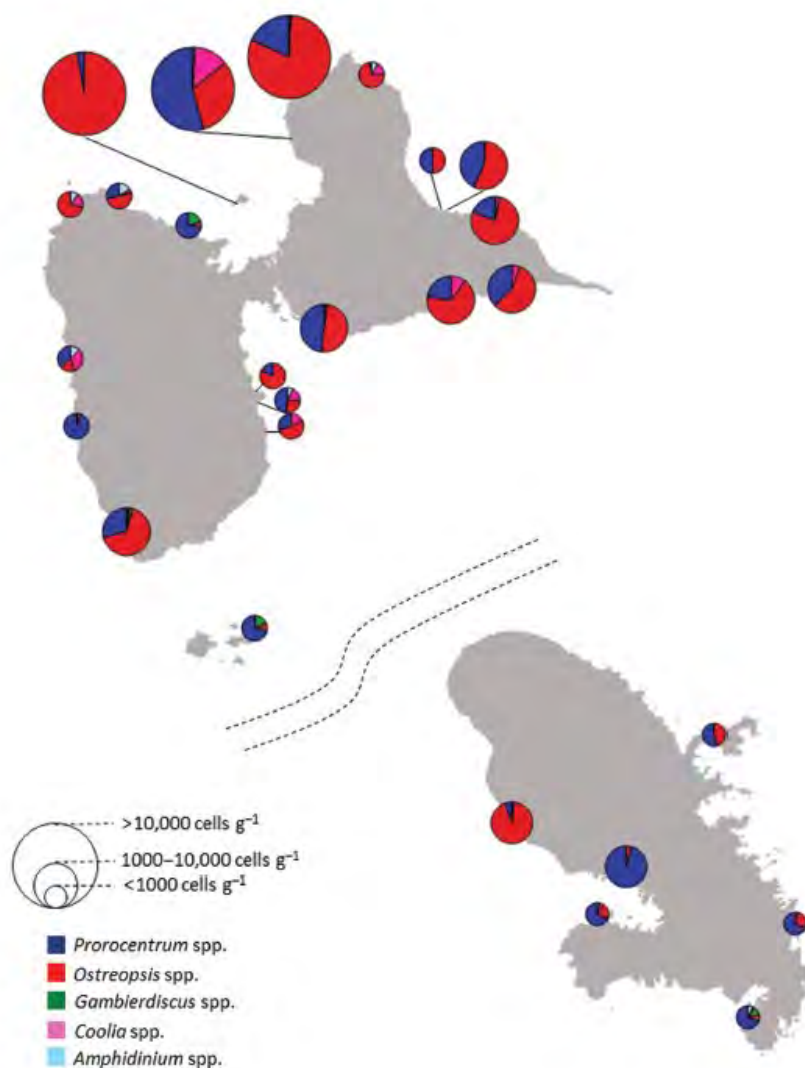


Figure 14 : Abondance des espèces de cinq genres de dinoflagellés benthiques en Guadeloupe (en haut) et en Martinique (en bas)

Les couleurs correspondent aux genres, la taille des cercles est en relation avec l'abondance (nombre de cellules par gramme de poids frais de macroalgues sur lesquelles elles ont été prélevées).

(Source Boisnoir *et al.*, 2019)

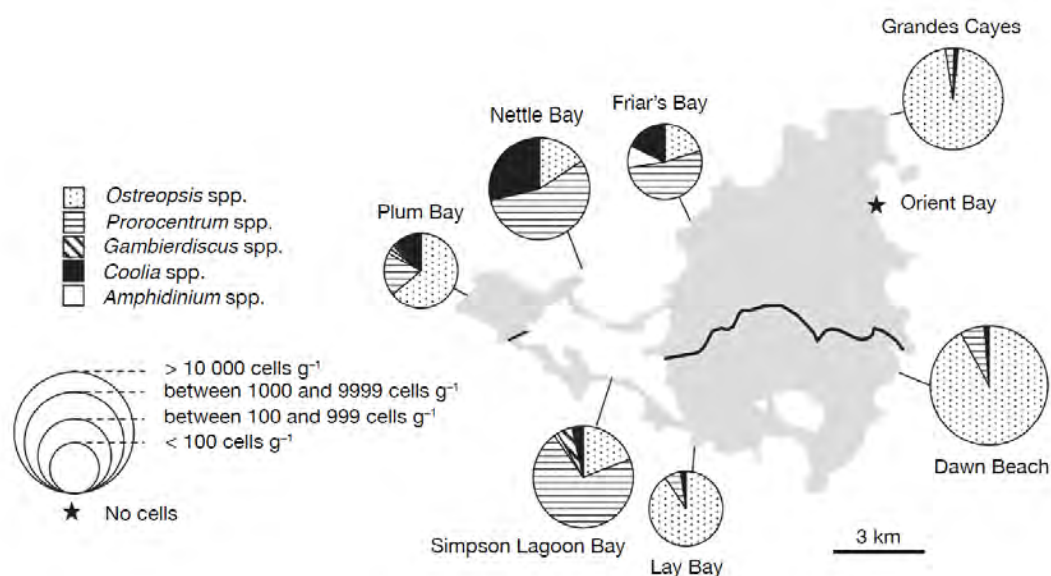


Figure 15 : Abondance des espèces de cinq genres de dinoflagellés benthiques à Saint Martin, partie française (au Nord) et partie néerlandaise (au Sud)

Les motifs de remplissage (points, lignes droites ou obliques, etc.) correspondent aux genres, la taille des cercles est en relation avec l'abondance (nombre de cellules par gramme de poids frais de macroalgues sur lesquelles elles ont été prélevées).

(Source Boisnoir *et al.*, 2020)

Au sein du bassin caribéen, neuf des douze espèces d'*Ostreopsis* décrites dans le monde ont été recensées (Boisnoir *et al.*, 2022). Ces derniers auteurs se sont particulièrement intéressés aux espèces de la Guadeloupe et ont démontré morphologiquement et génétiquement la présence d'*O. cf. ovata*, *O. lenticularis*, *O. siamensis* et *O. heptagona* dans cette île.

3.3.2.2 Île de la Réunion

La diversité des espèces du genre *Ostreopsis* est très peu étudiée à la Réunion. L'espèce *O. mascarenensis* a été décrite (morphologiquement) dans l'archipel des Mascareignes (incluant la Réunion) par Quod (1994), puis validée morpho-génétiquement par Chomérat *et al.* (2020b) sur des prélèvements réalisés à Sainte Rose, à l'est de la Réunion.

3.3.2.3 Nouvelle Calédonie et Polynésie française

La diversité des espèces du genre *Ostreopsis* est très peu étudiée dans les îles du Pacifique. À ce jour, deux espèces ont été détectées en Nouvelle Calédonie (Rhodes, 2011) et en Polynésie française (Chomérat *et al.*, 2020a): *O. ovata*, *O. lenticularis*. Chomérat *et al.* (2020a) ont également observé une importante prolifération d'*Ostreopsis* sp. 6 (voir paragraphe 3.2) sur la côte ouest de l'île de Tahiti. Ce taxon est également présent au Japon, en Thaïlande et en Corée. Selon ces auteurs et sur des bases génétiques et morphologiques, *Ostreopsis* sp. 6 pourrait en fait être la même espèce que *O. siamensis*. Seule une étude de spécimens provenant de la localité type pourrait valider cette hypothèse. Récemment une nouvelle espèce a été identifiée aux îles Cook, *O. tairoto* sp. nov. (anciennement *Ostreopsis* sp. 3, Verma *et al.*, 2023).

3.3.3 Distribution en Méditerranée et sur la côte atlantique européenne

3.3.3.1 En Méditerranée

Depuis deux à trois décennies, une augmentation des observations de proliférations d'*Ostreopsis* spp. a été rapportée dans les zones tempérées, et plus particulièrement en Méditerranée (Zingone *et al.*, 2021). En effet, depuis sa première identification dans le plancton de la rade de Villefranche-sur-Mer en 1972 (Taylor, 1979), *Ostreopsis* spp. a été observée dans plusieurs zones du pourtour Méditerranéen (Zingone *et al.*, 2021), notamment dans la partie nord-occidentale le long des côtes catalanes espagnoles (Vila, Garcés et Masó, 2001), des côtes françaises (Mangialajo *et al.*, 2008) et italiennes (Accoroni *et al.*, 2011; Tognetto *et al.* 1995), mais également sur les côtes algériennes et tunisiennes (Illoul *et al.*, 2012; Turki, Harzallah et Sammari, 2006), grecques (Aligizaki et Nikolaidis, 2006) et libanaises (Accoroni et Totti, 2016). Parmi les espèces d'*Ostreopsis* présentes en Méditerranée, *O. cf. ovata* semble être la plus répandue, notamment dans la partie nord-occidentale, tandis que *O. cf. siamensis* et *O. fattorussoi* ont surtout été observées en Méditerranée occidentale (Espagne, Tunisie, Italie) et orientale (Chypre, Liban) (Accoroni *et al.*, 2016a ; Accoroni *et al.*, 2016b ; Accoroni et Totti, 2016 ; Battocchi *et al.*, 2010).

Dans le cadre d'une mission scientifique et éducative réalisée entre Gibraltar et le détroit des Dardanelles en 2013 et 2014, *O. cf. ovata* et *O. cf. siamensis* ont été recensés sur plusieurs sites (Couet et Lemée, communication personnelle). Une carte de distribution des espèces d'*Ostreopsis* en Méditerranée a été élaborée à partir des données disponibles dans la littérature (Figure 16).

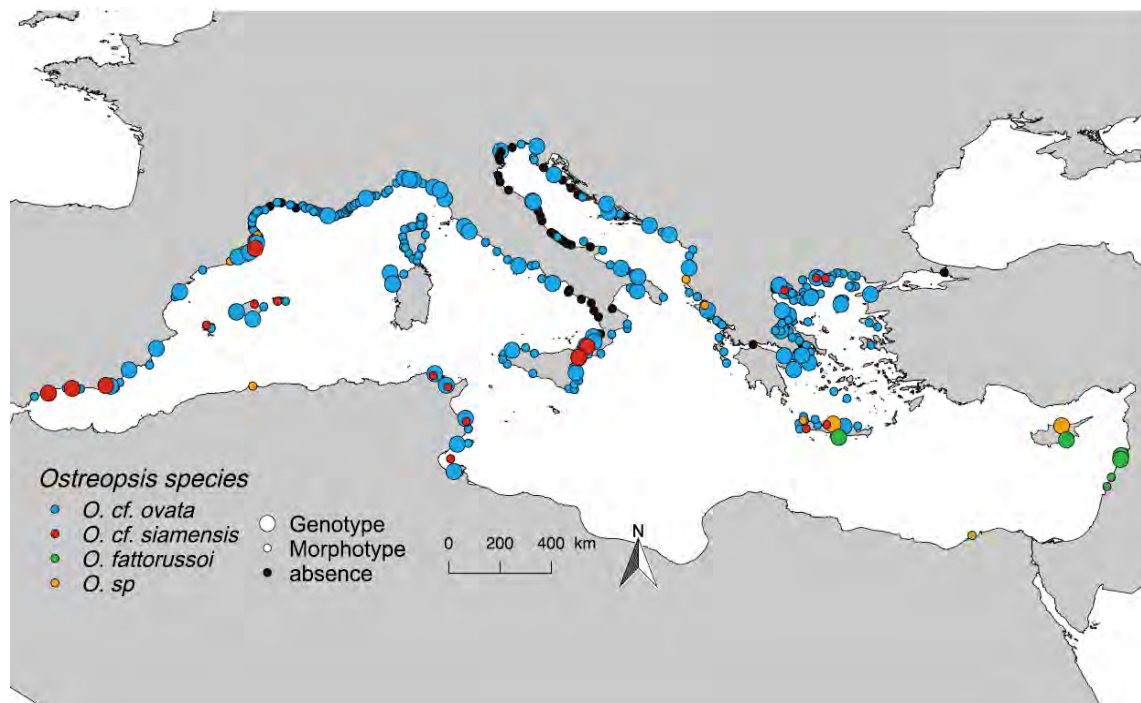


Figure 16 : Carte de distribution des espèces du genre *Ostreopsis* en Méditerranée, en différenciant les morphotypes (identification par la morphologie) et les génotypes (identification moléculaire)

Le tableau ci-après dresse une liste, par pays, et les publications utilisées pour créer cette carte.

| Country | Reference | Country | Reference |
|---------|--------------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| Spain | Penna et al., (2014) | Egypt | Ismael and Halim, (2012) |
| | Penna et al., (2012) | | Lebanon |
| | Penna et al., (2005) | Accoroni et al., (2016) | |
| | Vila et al., (2008) | Cyprus | |
| | Vila et al., (2001) | | Vassali et al., (2018) |
| France | Jauzein et al., (2018) | Algeria | Illoul et al., (2012) |
| | Penna et al., (2014) | | Turkey |
| | Penna et al., (2012) | Tunisia | |
| | Grossel et al., (2012) | | Ben-Gharbia et al., (2016) |
| Italia | ISPRA, (2016) | | Ben et al., (2015) |
| | Penna et al., (2014) | | Mabrouk et al., (2014) |
| | Penna et al., (2012) | Mabrouk et al., (2012) | |
| | Blasutto et al., (2010) | Penna et al., (2012) | |
| | Penna et al., (2005) | Turki et al., (2006) | |
| | Ciminiello et al., (2013) | Turki, (2005) | |
| Croatia | Ninčević Gladan et al., (2019) | Vassalli et al., (2018) | |
| | Pfannkuchen et al., (2012) | Greece | Penna et al., (2014) |
| | Bravo et al., (2012) | | Penna et al., (2012) |
| Albania | Saracino and Rubino, (2006) | Aligizaki et al., (2009) | |
| | Bushati et al., (2010) | Aligizaki and Nikolaidis, (2006) | |
| | | Vassalli et al., (2018) | |

Cette carte montre l'omniprésence d'espèces du genre *Ostreopsis* sur la côte nord de la Méditerranée et en particulier du morphotype *O. cf. ovata*, et l'absence de ce genre dans les zones très sableuses (Grossel, Blanfuné et Thibaut, 2012; ISPRA, 2019). Cependant, le faible nombre de sites recensant *Ostreopsis* sur les côtes Sud et Est de la Méditerranée est probablement dû à un effort d'échantillonnage plus faible dans ces zones. Lorsque des études sont réalisées, *Ostreopsis* est souvent observée (cf. les études en Tunisie et au Liban, avec les références associées à la Figure 16).

3.3.3.2 En Atlantique côtes européennes

En dehors de la Méditerranée, le genre *Ostreopsis* est également observé sur les côtes atlantiques de la péninsule ibérique ainsi que dans le Golfe de Gascogne. Ce n'est que récemment qu'*Ostreopsis* spp. a été détectée sur la façade atlantique de la péninsule ibérique (Amorim, Veloso et Penna 2010; Laza-Martinez, Orive et Miguel 2011) et, contrairement à la Méditerranée, le morphotype le plus répandu dans cette zone est *O. cf. siamensis*. Les deux morphotypes *O. cf. siamensis* et *O. cf. ovata* ont été observés au sud du Portugal (David et al., 2013; Santos et al., 2019) tandis que seul *O. cf. siamensis* a été observé au nord de la péninsule, où il forme des proliférations dans le sud-est du Golfe de Gascogne (Laza-Martinez, Orive et Miguel, 2011).

Au niveau du littoral atlantique français, une mission menée en 2018 a montré la présence d'*O. cf. siamensis* (Figure 17 à Figure 19) (Drouet et al., 2021). Cette étude, validée par des méthodes de biologie moléculaire (analyse de l'ADN environnemental (ADNe) et qPCR), a révélé que de l'ADN d'*O. cf. siamensis* était présent jusqu'à Plougerneau (Finistère, Bretagne). Les cellules entières d'*O. cf. siamensis* recherchées au microscope optique, n'ont été quant à elles observées que jusqu'à Saint-Jean-de-Luz (Pyrénées-Atlantique, Nouvelle-Aquitaine).



Figure 17 : Carte de la zone étudiée lors d’une mission réalisée en 2018 par Drouet et collaborateurs. Les points représentent les sites de prélèvement

(Source Drouet *et al.*, 2021).

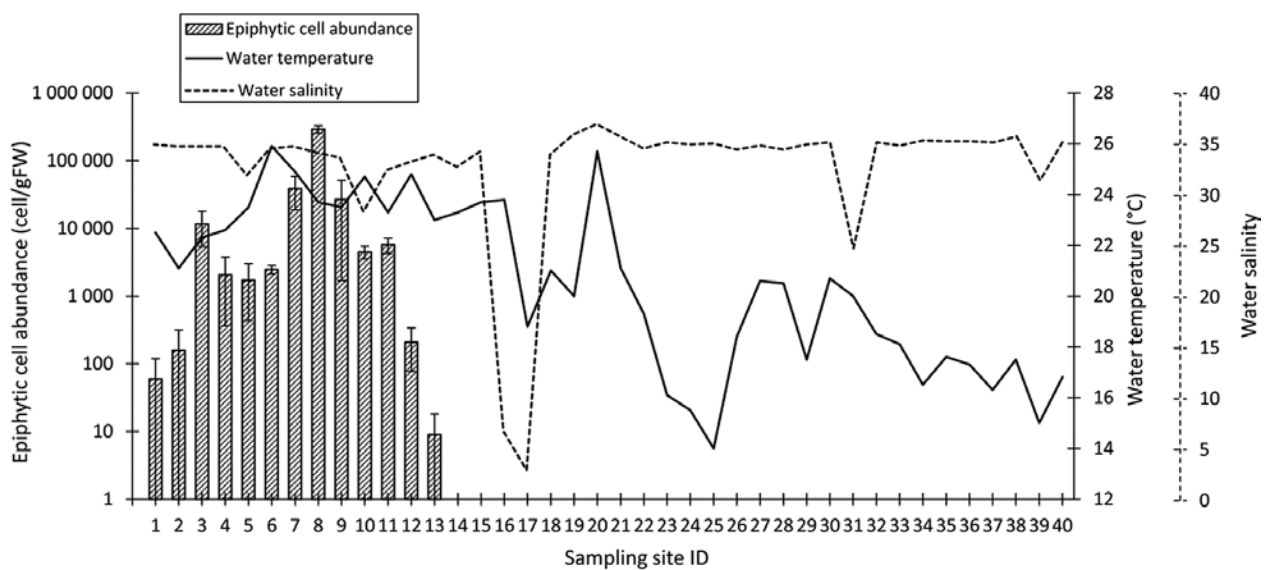


Figure 18 : Abondance d’*O. cf. siamensis* benthique estimée par comptage au microscope optique (en nombre de cellules par gramme de poids frais de macroalgues sur lesquelles elles ont été prélevées) et température et salinité de l’eau de mer sur les sites de prélèvement figurant dans la Figure 17

Source : (Drouet *et al.*, 2021).

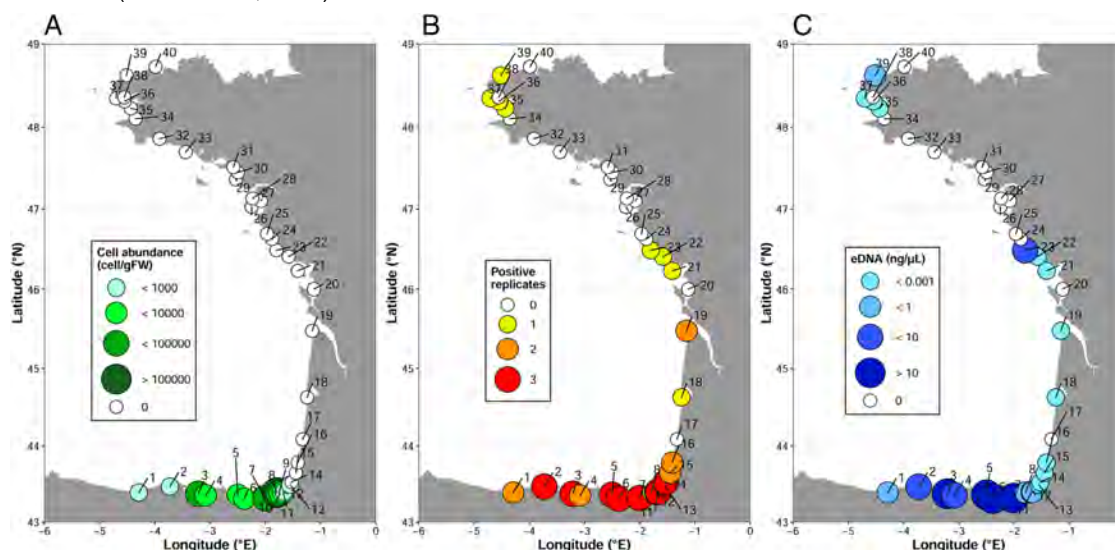


Figure 19 : Distribution d'*O. cf. siamensis* estimée par trois approches : A : comptage au microscope d'*O. cf. siamensis* benthique (en nombre de cellules par gramme de poids frais de macroalgues sur lesquelles elles ont été prélevées) ; B : analyses par qPCR ; C : détection de l'eDNA

(Source Drouet *et al.*, 2021).

Par ailleurs, des prélèvements effectués par l'Ifremer sur la côte basque française au cours de l'été 2021 ont révélé, par l'utilisation d'outils de biologie moléculaire, la présence conjointe de *O. cf. siamensis* et *O. cf. ovata* (Amzil *et al.*, 2021 ; Chomerat *et al.*, 2022).

3.3.3.3 Analyse des données du REPHY

Le REPHY est le Réseau d'observation et de surveillance du phytoplancton de l'Ifremer⁷. Les zones de prélèvements dans le cadre de ce réseau sont principalement des sites aquacoles marins, zones souvent sableuses peu propices au développement des espèces du genre *Ostreopsis*. Par ailleurs, le protocole utilisé ne permet de disposer que des concentrations en cellules planctoniques d'*Ostreopsis* (dans la colonne d'eau) avec une identification limitée au niveau du genre. Ces données sont néanmoins d'une grande importance pour tenter de tracer l'historique de l'apparition du genre *Ostreopsis* sur le littoral français.

Dans le cadre du REPHY, c'est en 1993 que le genre *Ostreopsis* a été observé pour la première fois en France, au point Couronne (Golfe de Fos, Méditerranée). Depuis, les abondances les plus importantes sont observées en Méditerranée et principalement à l'anse Méjan (Rade de Toulon) et au Cap Couronne.

3.4 Points à retenir

- Les organismes unicellulaires du genre *Ostreopsis* sont des microalgues de la classe des Dinophycées d'environ 40 à 100 μm de longueur et possédant deux flagelles. Elles ont la forme d'une lentille plus ou moins aplatie et le genre est facilement reconnaissable avec un microscope optique.

⁷ <https://wwz.ifremer.fr/lerpc/Activites-et-Missions/Surveillance/REPHY>

- Il existe douze espèces du genre *Ostreopsis* décrites à ce jour. La proximité morphologique de certaines espèces, associée à la variabilité morphologique au sein d'une même espèce, rendent l'identification génétique indispensable.
- Les études de biologie moléculaire suggèrent la présence d'autres espèces (nommées espèces cryptiques). Le terme « cf. » (confer en latin) retrouvé dans *Ostreopsis cf. ovata* et *Ostreopsis cf. siamensis* précise que ces espèces ressemblent morphologiquement à *Ostreopsis ovata* et *Ostreopsis siamensis*, mais que les données de biologie moléculaire sont absentes ou trop parcellaires pour confirmer qu'il s'agit bien de ces espèces.
- Les espèces du genre *Ostreopsis* sont principalement tropicales, mais on trouve certaines espèces de ce genre de plus en plus souvent dans les zones tempérées de l'hémisphères nord et sud, depuis une vingtaine d'années.
- Trois espèces sont présentes en Méditerranée : *Ostreopsis cf. ovata*, *Ostreopsis cf. siamensis* et *Ostreopsis fattorussoi*. Sur la côte méditerranéenne française, seule *Ostreopsis cf. ovata* a été identifiée.
- Sur les côtes atlantiques européennes, *Ostreopsis cf. ovata* et *Ostreopsis cf. siamensis* ont été observées au sud du Portugal. Jusqu'en 2018, seule *Ostreopsis cf. siamensis* avait été observée dans le Golfe de Gascogne. Depuis 2021, la présence conjointe d'*Ostreopsis cf. ovata* et d'*Ostreopsis cf. siamensis* a été démontrée sur la côte basque française. Les abondances maximales d'*Ostreopsis* sous forme benthique sont généralement plus faibles dans les zones tropicales (le plus souvent quelques milliers ou dizaines de milliers de cellules par gramme de poids frais de macroalgue) que dans les zones tempérées (le plus souvent quelques centaines de milliers ou millions de cellules par gramme de poids frais de macroalgue).

4 Biologie et écologie des espèces du genre *Ostreopsis*

4.1 Développement des espèces du genre *Ostreopsis* dans les différents compartiments (benthique, planctonique et surface de l'eau)

Les espèces du genre *Ostreopsis* se développent sous forme de biofilms, sur des substrats biotiques tels que les macrophytes (Figure 20, gauche), ou abiotiques (rochers/galets par exemple, Figure 20, droite), généralement dans des zones peu profondes et relativement abritées des vents et des courants (Mangialajo *et al.*, 2011). Lorsque les conditions environnementales sont favorables à leur croissance, les cellules d'*O. cf. ovata* prolifèrent rapidement (avec un taux net maximal de croissance d'environ $0,75 \text{ j}^{-1}$) et forment des proliférations avec des densités cellulaires pouvant dépasser 2 millions cell/g de poids frais (PF) de macrophyte, notamment en Méditerranée Nord-Occidentale (Mangialajo *et al.*, 2008).



Figure 20 : Photos illustrant le développement d'*O. cf. ovata* sur des macroalgues (à gauche) et des galets (à droite) à Rochambeau (Villefranche-sur-Mer, France)

Crédit photos : Laboratoire d'Océanographie de Villefranche.

Les cellules adhèrent au substrat par la production d'une matrice mucilagineuse formée d'un réseau de fibres dérivant des trichocystes⁸ extrudés à travers les pores thécaux et d'une matrice amorphe de polysaccharides (colorée au bleu Alcian sur la Figure 21 (Honsell *et al.*, 2013). En plus du rôle prépondérant de ce mucus dans l'adhésion au substrat, de plus en plus d'auteurs suggèrent que cette matrice pourrait également avoir un rôle dans la défense contre les prédateurs et les compétiteurs (Giussani *et al.*, 2015; Ternon *et al.*, 2022a). En effet, des images en microscopie à force atomique (AFM) suggèrent l'existence d'un mécanisme d'extrusion des trichocystes qui viendrait réguler de façon active la toxicité d'*O. cf. ovata* (Giussani *et al.*, 2015). Le mucus pourrait piéger les toxines (ou d'autres molécules) produites par *Ostreopsis* et ainsi avoir un rôle important dans les interactions écologiques (allélopathie, compétition pour les nutriments ou la surface) entre *O. cf. ovata* et les autres microalgues benthiques (comme des diatomées) (Ternon *et al.*, 2022a ; Ternon *et al.*, 2018). Le « tapis » formé par *Ostreopsis* pourrait également être un substrat (c'est-à-dire être une ressource

⁸ Un trichocyste est un organite présent dans certains ciliés et dinoflagellés.

nutritive) pour les différentes bactéries qui se succèdent tout au long des proliférations (Bellés-Garulera *et al.*, 2016 ; Guidi, Pezzolesi et Vanucci, 2018 ; Vanucci *et al.*, 2016). Comme pour d'autres dinoflagellés, on ne peut pas éliminer l'hypothèse que certaines bactéries associées aux cellules d'*Ostreopsis* sont impliquées dans le processus de production ou de transformation/dégradation des toxines d'*Ostreopsis* (Pavaux, Berdalet et Lemée, 2020).

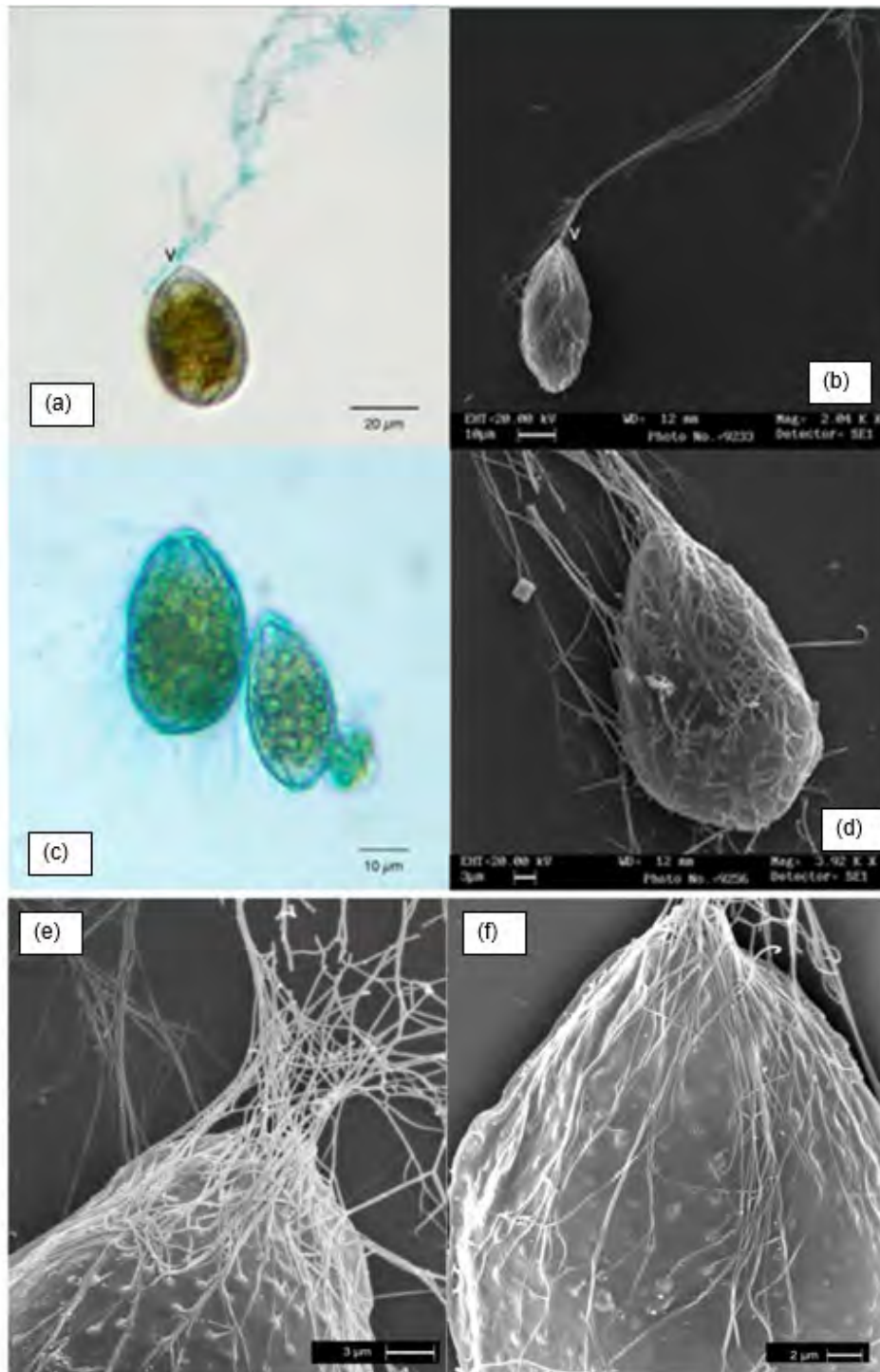


Figure 21 : Photos du mucilage produit par *O. cf. ovata* en microscopie optique (a, c) et électronique à balayage (b, d-f)

(a) Cellule d'*O. cf. ovata* produisant, par sa partie ventrale (v), du mucus partiellement marqué au bleu Alcian ; (b) Cellule unique avec un long filament issu de sa face ventrale (v) observée par microscopie électronique à balayage. Le filament semble être formé de plusieurs filaments plus fins. Barre d'échelle 10 µm ; (c) Cellules fixées au glutaraldéhyde colorées au bleu Alcian montrant une réaction positive du contour cellulaire, du cytoplasme périphérique et de la zone ventrale. Des filaments minces colorés en bleu partent de la surface

cellulaire. Barre d'échelle 10 μm ; (d) Cellule observée par microscopie électronique à balayage montrant de nombreux trichocystes extrudés à travers les pores thécaux sur toute la surface cellulaire. Barre d'échelle 3 μm ; (e) Extrémité ventrale de la cellule observée au microscope électronique à balayage montrant de nombreux trichocystes extrudés à travers les pores thécaux et qui convergent à l'extrémité ventrale de la cellule où ils fusionnent pour former un seul filament plus épais. Barre d'échelle 3 μm ; (f) Zoom sur les trichocystes émergeant à travers les pores thécaux répartis sur toute la surface cellulaire. La plupart des trichocystes sont dirigés vers l'extrémité ventrale de la cellule. Barre d'échelle 2 μm .

(Source Honsell *et al.*, 2013).

Même si les espèces du genre *Ostreopsis* sont couramment décrites comme des dinoflagellés benthiques (Lenoir *et al.*, 2004; Mangialajo *et al.*, 2008; Penna *et al.*, 2010), elles présentent une « phase planctonique » au cours de laquelle les cellules benthiques se détachent du substrat et sont mises en suspension dans la colonne d'eau. À ce titre, *O. cf. ovata* peut être considérée comme tychoplanctonique (c'est-à-dire occasionnellement planctonique). Par ailleurs, des agrégats contenant de grandes quantités de cellules et de mucus peuvent également se détacher de leur substrat et flotter dans la colonne d'eau et à la surface (Figure 22 et Figure 23), ils sont alors communément appelés « fleurs d'eau ». Les mécanismes à l'origine de ce passage d'un mode de vie benthique à un mode de vie planctonique ne sont pas encore bien connus. Il est cependant suggéré que l'hydrodynamisme associé aux tempêtes ou aux brises thermiques estivales et diurnes peut provoquer un détachement des biofilms (Mangialajo *et al.*, 2011; Vila *et al.*, 2016). Par ailleurs, comme cela a été observé pour d'autres microorganismes présentant une écologie similaire (à l'exemple de certaines cyanobactéries benthiques formant des biofilms épais), les bulles d'oxygène produites par la photosynthèse et piégées dans les biofilms pourraient contribuer à faire remonter les agrégats. D'autre part il pourrait exister une migration verticale intrinsèque (i.e. avec un horloge biologique endogène) de cette espèce qui se ferait selon un rythme nyctéméral⁹ (hypothèse développée dans Pavaux *et al.*, 2019).



Figure 22 : Fleurs d'eau d'*O. cf. ovata*

(Source Mangialajo *et al.*, 2011).

⁹ Rythme nyctéméral : influencé par l'intensité de la lumière naturelle du soleil

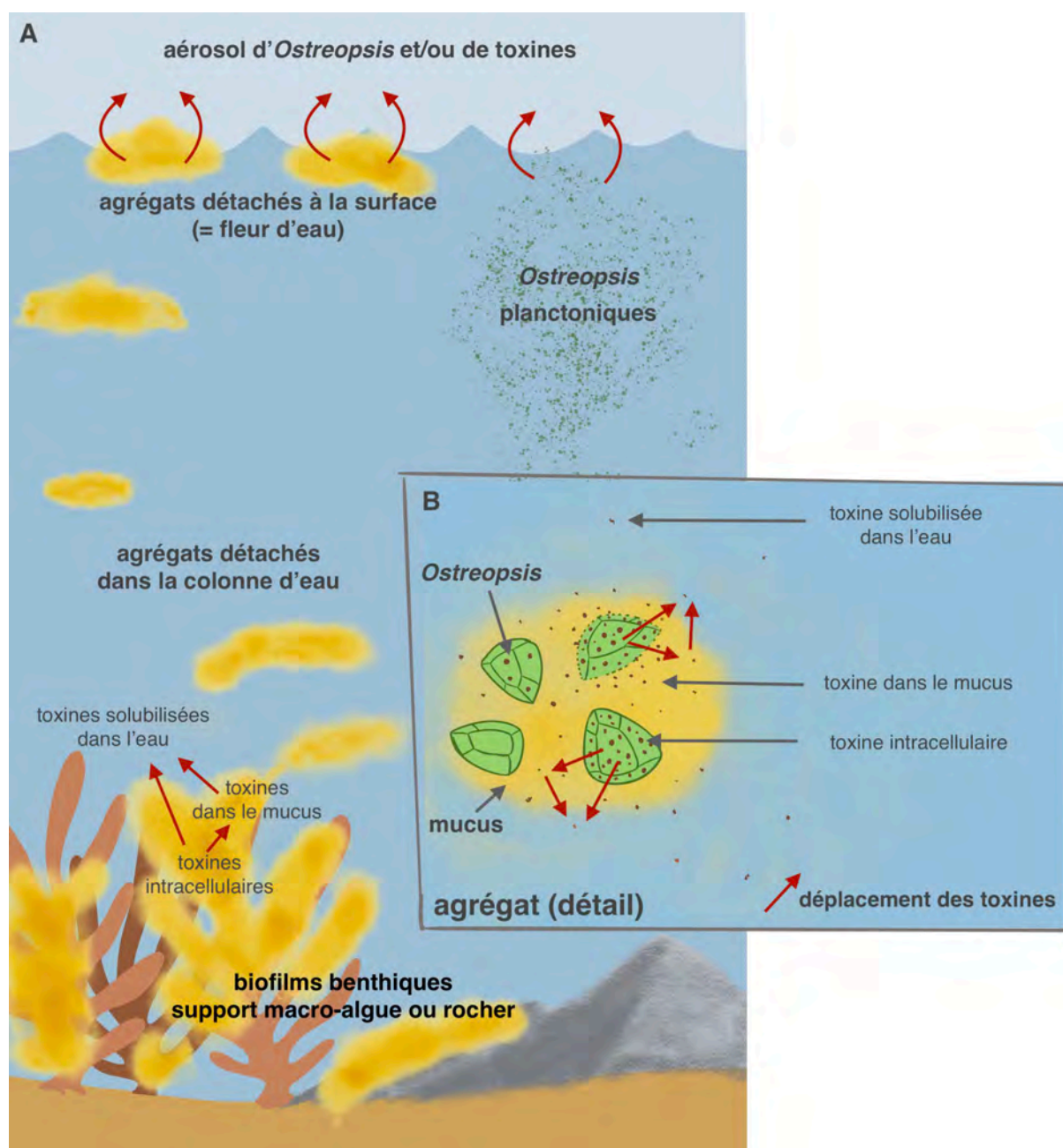


Figure 23 : représentation schématique des deux phases, benthique et planctonique, du développement d'*Ostreopsis*

A) représentation schématique des deux phases, benthique et planctonique, du développement d'*Ostreopsis*, et de la distribution associée des toxines (flèches et points rouges). Les biofilms peuvent se détacher de leurs supports et se disperser dans la colonne d'eau (agrégats). Leur grande flottabilité les fait remonter à la surface de l'eau (fleur d'eau)

B) : détail d'un biofilm (benthique ou « détaché ») constitué de cellules d'*Ostreopsis* spp. « piégées » dans le mucus (filaments de polysaccharides)

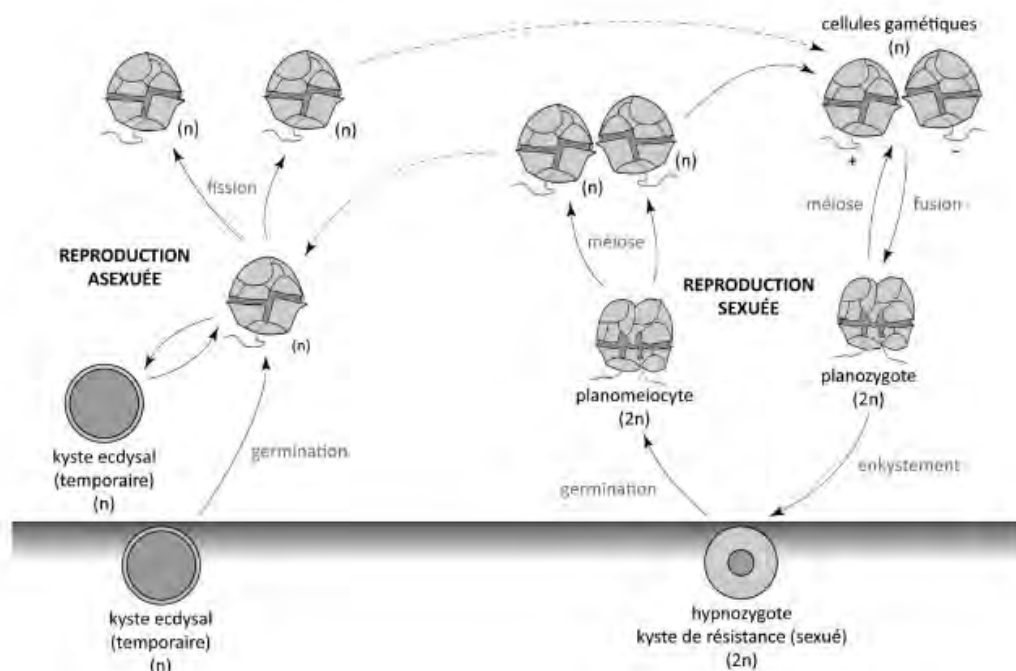
Des processus de migration verticale avec une horloge biologique endogène ont déjà été décrits chez d'autres dinoflagellés essentiellement planctoniques tels que *Alexandrium tamarense* (Fauchot, Lévasséur et Roy, 2005), mais ils n'avaient jamais été étudiés chez les dinoflagellés benthiques. Des travaux récents sur *O. cf. ovata* ont mis en évidence que la distribution verticale des cellules variait au cours de la journée (Figure 24) (Pavaux *et al.*, 2021). Ces travaux reposaient sur un suivi à haute fréquence temporelle (prélèvements toutes

les quatre heures pendant soixante-douze heures) afin d'estimer les abondances cellulaires dans les trois compartiments (benthique, planctonique et surface). Les résultats ont montré des variations importantes de ces abondances cellulaires dans ces trois compartiments au cours de la journée, suggérant une alternance de phases de mise en suspension et de sédimentation des cellules. En Méditerranée, les abondances cellulaires au niveau du compartiment benthique sont généralement maximales le matin entre 8h et 12h (surtout visible en phase stationnaire et de déclin de la prolifération). Dans la colonne d'eau et en surface les abondances sont maximales plus tardivement dans l'après-midi (vers 16h). Cette variabilité devrait être prise en compte dans les stratégies d'échantillonnage des suivis sanitaires d'*O. cf. ovata*.

Il est important de noter que ces variations d'abondance entre le fond et la surface n'ont été étudiées pour l'instant que pour *O. cf. ovata* et que l'on ignore si ces mécanismes s'observent également chez les autres espèces du genre *Ostreopsis*.

4.1.1 Modes de reproduction d'*Ostreopsis* spp.

Les cellules du genre *Ostreopsis* se reproduisent de manière asexuée ou sexuée et peuvent s'enkyster (Figure 24 et Figure 25). La division cellulaire asexuée est réalisée par une division de la thèque, appelée « desmoschisis » (Bravo *et al.*, 2012). À ce jour, le seul travail disponible sur la division cellulaire de ce genre a été réalisé sur des cellules d'*O. cf. ovata* prélevées dans le compartiment benthique ; il a montré que cette division survenait la nuit (Pavaux *et al.*, 2021). Le nombre de cellules en division est maximal 3 à 4 heures avant l'aube. La reproduction sexuée est difficilement observable et seules les paires de gamètes peuvent être distinguées des stades végétatifs (Figure 25).



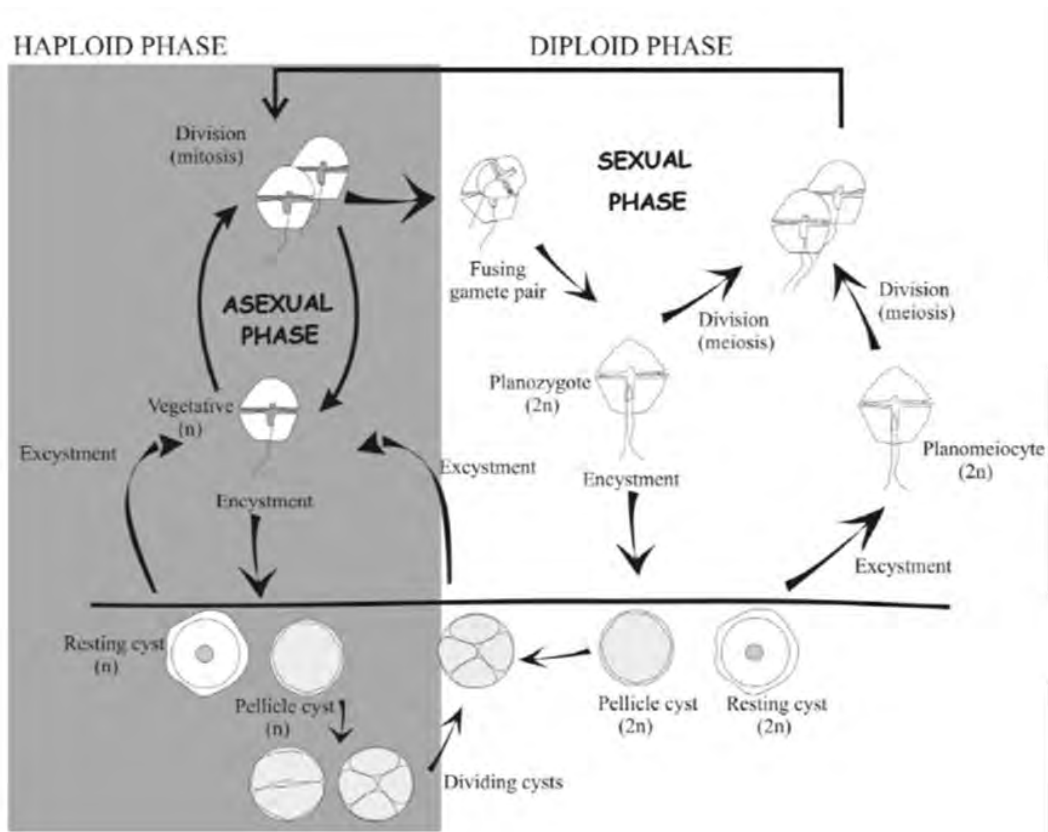


Figure 24 : Schéma représentant le cycle de vie le plus communément observé chez les dinoflagellés, avec les reproductions sexuées, asexuées et l'enkystement

(Source Chapelle *et al.*, 2014)

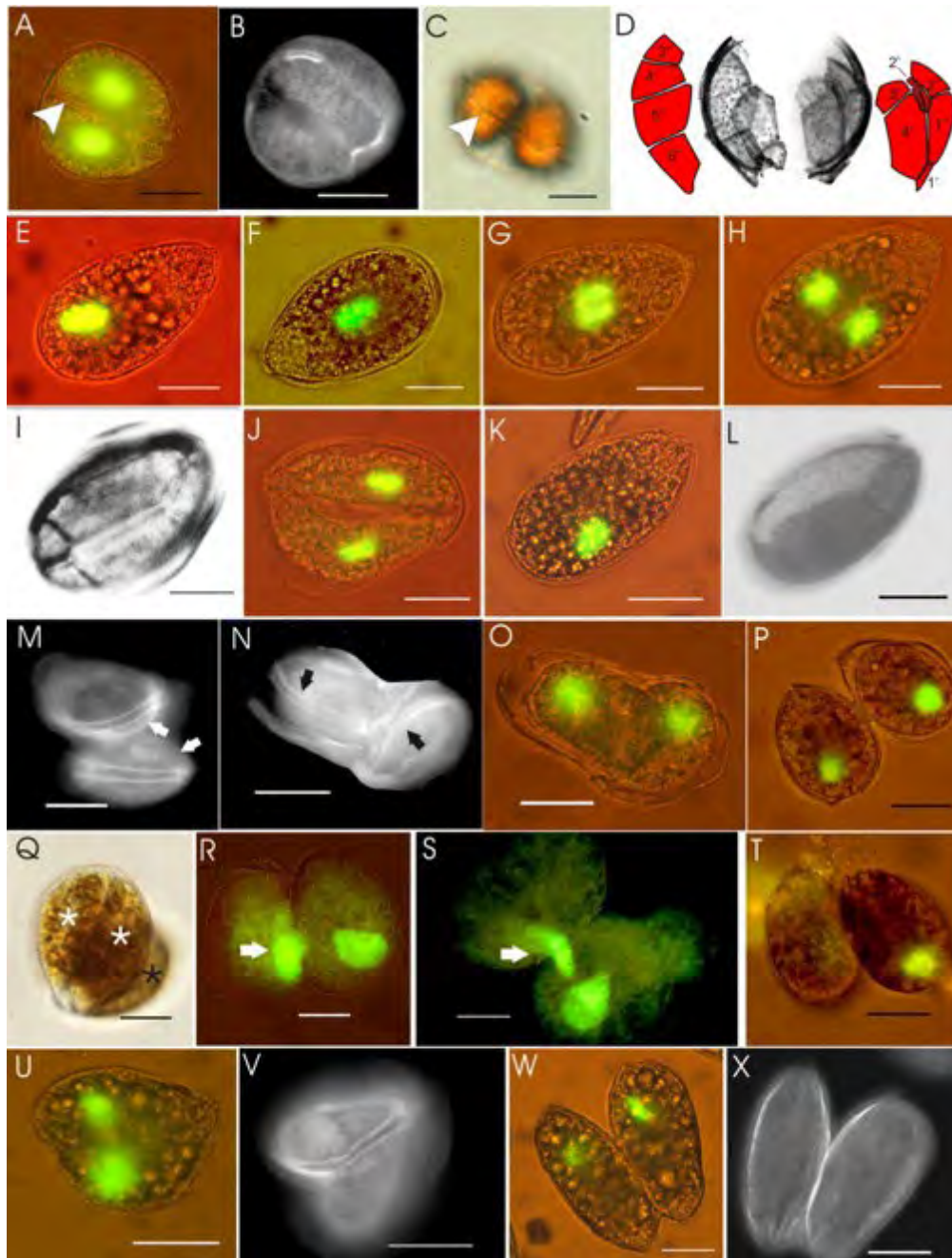


Figure 25 : Cycle de vie asexué (A-L) et sexué (M-X) d'*O. cf. ovata* provenant de cultures ou d'échantillons prélevés *in situ*

(A) Une cellule en culture, en division avec deux noyaux et une paroi cloisonnée (tête de flèche) ; (B) Thèque de la cellule A colorée au calcofluor ; (C) La flèche pointe le cingulum d'une cellule en division ; (D) schéma de la séparation des plaques thécales lors de la division cellulaire en culture ; (E) Cellule prélevée *in situ*, au stade végétatif ; (F) Cellule provenant d'échantillons naturels avec le noyau situé au centre de la cellule, à un stade précédant la caryocinèse ; (G) caryocinèse dans une cellule prélevée *in situ* ; (H) cellules à double nucléation, avec de légères indications d'une paroi de séparation ; (I) la même cellule colorée au calcofluor ; (J) cellules à double nucléation en cytokinèse ; (K) cellule récemment séparée ; (L) la même cellule colorée au calcofluor ; (M) paire de gamètes en culture attachée par des épithèques (flèches); (N) les flèches montrent les cingula d'une paire de gamètes en culture ; (O) noyaux des mêmes cellules que dans N ; (P) la flèche pointe vers le contact thécal dans une paire de gamètes en culture ; (Q) une cellule en division issue de l'accouplement des gamètes en culture (astérisques blancs) ; (R) le noyau fixé à la paroi (flèche) d'une paire de gamètes en culture ; (S) paire de gamètes accouplés en culture dans laquelle un noyau (flèche) est transféré d'un gamète à l'autre ; (T) paire de gamètes en culture avec une seule cellule nucléée ; (U) paire de gamètes s'accouplant dans un état avancé de fusion, provenant d'échantillons naturels ; (V) les mêmes cellules colorées au calcofluor ; (W) paire de gamètes s'accouplant avec

uniquement un contact de surface entre les gamètes ; (X) les mêmes cellules colorées au calcofluor (barres d'échelle 20 µm).

(Source Bravo *et al.*, 2012).

4.2 Impacts des facteurs biotiques et abiotiques sur la croissance cellulaire des espèces du genre *Ostreopsis*

La plupart des études portant sur l'écologie des espèces d'*Ostreopsis* se sont focalisées sur *O. cf. ovata* et très peu d'informations sont disponibles pour les autres espèces, notamment *O. cf. siamensis*.

4.2.1 Influence des facteurs abiotiques sur la croissance cellulaire

4.2.1.1 La température

La température de l'eau est généralement un facteur clé de la croissance des microorganismes notamment pour les dinoflagellés benthiques du genre *Ostreopsis* (Granéli *et al.*, 2011; Hallegraeff 2010). Les préférences thermiques observées pour *O. cf. ovata*, lors d'études en laboratoire, sont comprises entre 16 et 30°C et elles varient selon l'origine géographique des souches et les conditions expérimentales (Accoroni *et al.*, 2011; Ciminiello *et al.*, 2006; Cohu *et al.*, 2013; Gémin *et al.*, 2021; Granéli *et al.* 2011; Mangialajo *et al.*, 2008; Pezzolesi *et al.*, 2012; Pistocchi *et al.*, 2011; Simonini, Orlandi et Abbate, 2011; Totti *et al.*, 2010). Par exemple, la souche d'*O. cf. ovata* isolée à Naples par Scalco *et al.* (2012) est capable de se développer entre 18 et 30°C, avec des taux de croissance maximaux (de 0,55 à 0,83 j⁻¹) entre 22 et 26°C, alors que la souche isolée par Granéli *et al.* (2011) à Gênes, se développe entre 16 et 30°C avec un optimum de croissance (de 0,52 à 0,75 j⁻¹) entre 26 et 30°C. En comparaison, la souche d'*O. cf. ovata* isolée au Japon par Selina et Orlova (2010) se développe à des températures plus faibles (entre 7°C et 25°C ; taux de croissance non indiqués).

Concernant *O. cf. siamensis*, une souche isolée sur la côte est de la Tasmanie se développe entre 30 et 45°C mais elle tolère également des températures de 10°C en phase de dormance (kystes) (Pearce, Marshall et Hallegraeff, 2001). Une souche isolée en Nouvelle-Zélande supporte quant à elle des températures comprises entre 15°C et 25°C (Rhodes *et al.*, 2000). Enfin, une souche isolée en Floride par Morton, Norris et Bomber (1992) se développe en laboratoire entre 23 et 33°C avec une croissance maximale (0,43 j⁻¹) à 29°C.

Les études de terrain ne sont pas nécessairement en accord avec ces études en laboratoire. Par exemple, aucun lien significatif n'a pu être établi *in situ* entre les variations d'abondance cellulaires d'*O. cf. ovata* et les variations de la température de l'eau dans les travaux de Gémin *et al.* (2021) et de Pistocchi *et al.* (2011).

Les résultats concernant les liens entre la température de l'eau et la dynamique de développement des proliférations d'*O. cf. ovata* (date de début, durée et intensité) sont variables selon les sites étudiés. Par exemple, sur les côtes méditerranéennes françaises, les proliférations de cette espèce commencent souvent en juillet lorsque la température de l'eau atteint 23°C et elles déclinent lorsque les températures dépassent 28°C (Drouet, 2020 ; Mangialajo *et al.*, 2011). Au nord de la mer Adriatique, les proliférations d'*O. cf. ovata* s'observent plutôt à la fin de l'été alors que les températures de l'eau diminuent et atteignent 25°C (Accoroni *et al.*, 2011). Les travaux de Drouet *et al.* (2022) montrent une forte corrélation

positive entre la température des eaux de surface au printemps et la date de début des proliférations d'*O. cf. ovata* à Monaco (plus le printemps est chaud et plus le développement de la prolifération est précoce). En Italie, le modèle mathématique mis en place dans la région de Gênes pour la gestion des proliférations a montré que le paramètre température de surface de l'eau, suivi par le paramètre salinité, permettaient une prédiction correcte du développement des proliférations d'*O. cf. ovata* (Asnaghi *et al.*, 2017).

4.2.1.2 La salinité

En milieu contrôlé, il a été mesuré qu'une souche méditerranéenne d'*O. cf. ovata* était tolérante à une gamme de salinité comprise entre 26 et 40 psu¹⁰ (Pezzolesi *et al.*, 2012) et une souche thaïlandaise l'est entre 25 et 30 psu (Tawong *et al.*, 2015). Pour *O. cf. siamensis* une tolérance entre 28 et 34 psu a été observée (Rhodes *et al.*, 2000). Dans le milieu naturel, des proliférations d'*Ostreopsis* spp. ont été observées à des salinités comprises entre 26,7 et 39,3 psu en Méditerranée (Adriatique et Mer Ligure ; Accoroni *et al.*, 2015; Mangialajo *et al.*, 2008; Monti *et al.*, 2007) et dans le Pacifique (Hawaii ; Parsons et Preskitt, 2007).

Selon Pistocchi *et al.* (2011), dans une gamme de valeurs allant de 25 à 40 psu, la salinité semble ne pas jouer un rôle important dans la croissance d'*Ostreopsis* spp. Ces résultats sont confirmés par ceux de Pezzolesi *et al.* (2012) qui ont montré que le taux de croissance d'*O. cf. ovata* n'était pas influencé par la salinité pour des valeurs comprises entre 26 et 40 psu. Par contre, il existe de nombreuses publications montrant le contraire (Accoroni *et al.*, 2015; Carnicer *et al.*, 2015; Delgado *et al.*, 2006; Mangialajo *et al.*, 2008; Monti *et al.*, 2007; Morton, Norris et Bomber, 1992; Okolodkov *et al.*, 2007; Parsons et Preskitt, 2007; Pezzolesi *et al.*, 2012; Rhodes *et al.*, 2000). Par exemple, Parsons et Preskitt (2007) ont observé une corrélation négative entre la salinité et la croissance d'*O. ovata* sur les côtes hawaïennes (corrélation de Pearson = - 0,281, p = 0,001). Ces résultats contradictoires ne permettent pas, dans l'état actuel des connaissances, de déterminer l'influence de la salinité sur la croissance cellulaire d'*Ostreopsis*.

4.2.1.3 Hydrodynamisme

Les auteurs sont unanimes pour souligner l'importance de l'hydrodynamisme sur le développement et les proliférations d'*O. cf. ovata* et de *O. cf. siamensis*. Leurs travaux montrent que ces deux espèces se développent essentiellement dans des sites abrités des courants et/ou des vents, avec des abondances significativement plus importantes que dans des sites exposés (Accoroni *et al.*, 2011; Accoroni *et al.*, 2012; Barone, 2007; Mangialajo *et al.*, 2011; Shears et Ross, 2009; Totti *et al.*, 2010). En effet, l'action mécanique des vagues engendre une remise en suspension des cellules d'*Ostreopsis* attachées au substrat. Par ailleurs, des phénomènes extrêmes tels que des tempêtes peuvent provoquer une dispersion en quelques minutes des proliférations d'*Ostreopsis* suite à une forte remise en suspension des cellules et des biofilms qui sont alors emportés par les vagues.

À ce jour, aucune information n'a été retrouvée dans la littérature sur un impact potentiel des marées sur les proliférations d'*Ostreopsis*.

¹⁰ psu = « practical salinity unit ». En simplifiant, une unité psu correspondant à 1 g de sel pour 1 kg d'eau de mer (‰)

4.2.1.4 Nutriments/eutrophisation

La disponibilité en nutriments est souvent considérée comme un facteur important dans l'apparition et le contrôle des proliférations, que cela concerne des dinoflagellés toxiques ou d'autres organismes photosynthétiques. Il y a consensus autour du fait que l'enrichissement des zones côtières résultant des activités anthropiques qui conduit à leur eutrophisation, est un facteur majeur expliquant l'augmentation de la fréquence et l'intensité des proliférations d'algues nuisibles au niveau mondial. Si cette relation semble claire pour les dinoflagellés toxiques planctoniques (Parsons et Dortch 2002), elle l'est cependant beaucoup moins pour les dinoflagellés benthiques, dont les espèces du genre *Ostreopsis*. En effet, *O. cf. ovata* se développe aussi bien dans des zones eutrophes qu'oligotrophes (Accoroni *et al.*, 2011) et des proliférations d'*O. cf. siamensis* ont été rapportées dans des sites oligotrophes en Nouvelle-Zélande (Shears et Ross, 2009). Par ailleurs, les données récoltées lors de proliférations ne semblent montrer aucune relation significative entre les abondances cellulaires d'*Ostreopsis* et les concentrations en nutriments inorganiques (Parsons et Preskitt, 2007; Shears et Ross 2009; Vila, Garcés et Masó, 2001). Ces concentrations en nutriments dissous pendant les périodes de prolifération doivent cependant être interprétées avec prudence. En effet, pendant ces périodes, les nutriments biodisponibles sont consommés par l'ensemble des organismes et microorganismes photosynthétiques et incorporés dans la biomasse, conduisant ainsi à de très faibles concentrations en azote et phosphore dissous dans le milieu sans que cela ne traduise pour autant un état oligotrophe du milieu. En laboratoire, il a été montré que le phosphore et l'azote sont deux éléments qui peuvent potentiellement être limitants pour la croissance d'*O. cf. ovata* (Vanucci *et al.*, 2012). De plus, comme signalé précédemment, il semble exister une synergie entre un ratio N/P optimal et des températures élevées (> 25°C) qui se traduirait par une augmentation du taux de croissance d'*O. cf. ovata* en Adriatique (Accoroni *et al.*, 2015). Enfin, la mixotrophie (la capacité à être hétérotrophe¹¹ et autotrophe, simultanément ou non, selon les conditions environnementales) d'*O. cf. ovata* ne semble pas pouvoir expliquer le succès de son développement (Jauzein *et al.*, 2017).

4.2.1.5 Lumière et profondeur

Les études portant sur la relation entre intensité lumineuse et croissance font état de données qui semblent parfois contradictoires. En milieu contrôlé, un taux de croissance maximal est observé pour *O. cf. siamensis* et *O. heptagona* à 200 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Morton, Norris et Bomber, 1992), alors que pour *O. cf. ovata*, le taux de croissance maximal est observé à 50 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ou entre 200 et 600 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ selon Gémin *et al.* (2020a). Une corrélation positive entre l'augmentation de l'intensité lumineuse et le taux de croissance a été mise en évidence pour des souches japonaises du genre *Ostreopsis* spp. jusqu'à un seuil de 263 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ au-delà duquel une photoinhibition de la croissance est observée (Yamaguchi *et al.*, 2014). Pourtant, en milieu naturel, l'intensité lumineuse reçue à la profondeur à laquelle *Ostreopsis* prolifère peut atteindre fréquemment 1 800 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (ISPRA, 2012). Il est cependant possible que l'épaisseur des biofilms benthiques protège les cellules d'une intensité lumineuse trop importante.

¹¹ L'hétérotrophie est la nécessité pour un organisme vivant de se nourrir de matière organique préexistante. Elle s'oppose à l'autotrophie des organismes qui transforment de la matière minérale en matière organique.

En Méditerranée, les concentrations cellulaires d'*O. cf. ovata* diminuent rapidement avec la profondeur, entre 0,5 et 10 m (Cohu et Lemée, 2012; Richlen et Lobel, 2011; Totti *et al.*, 2010), ce qui soutient une préférence pour les fortes intensités lumineuses. Les concentrations cellulaires maximales sont rencontrées à 0,5 m de profondeur (Cohu *et al.*, 2013; Totti *et al.*, 2010). Aux Antilles, les mêmes observations ont été rapportées (Boisnoir *et al.*, 2018).

4.2.1.6 Substrat

Les études réalisées en mer Adriatique ont montré qu'*O. cf. ovata* est capable de se développer aussi bien sur des substrats durs abiotiques (rochers, galets) que sur des substrats biotiques (macrophytes) (Totti *et al.*, 2010). Ces auteurs ont cependant observé des concentrations cellulaires significativement plus élevées sur les substrats abiotiques. Ils suggèrent que les plus faibles biomasses d'*Ostreopsis* observées sur les substrats vivants pourraient s'expliquer par la production potentielle de composés allélopathiques par les organismes colonisés.

Par ailleurs, il a été observé une préférence d'*Ostreopsis* pour les macrophytes affichant une architecture tridimensionnelle complexe (Accoroni *et al.*, 2016a). Cette affinité pour les thalles complexes pourrait s'expliquer par une plus grande résistance au décrochement des cellules d'*O. cf. ovata* lors de l'action des vagues (Accoroni *et al.*, 2016a).

Dans deux revues de la littérature, les auteurs émettent l'hypothèse que les altérations des côtes méditerranéennes par des constructions anthropiques (bétonnage ou enrochements artificiels) favorisent l'expansion d'*O. cf. ovata*, qui colonise directement ces surfaces artificielles ou les macroalgues qui s'y développent (Montserrat *et al.*, 2022; Tester, Litaker et Berdalet, 2020).

4.2.2 Influence des facteurs biotiques sur le développement d'*Ostreopsis* spp.

4.2.2.1 Interactions proie-prédateur

Comme toutes les microalgues benthiques, les espèces du genre *Ostreopsis* constituent des proies pour des organismes appartenant à la méiofaune. Un nombre restreint d'études s'intéressent cependant aux interactions entre *Ostreopsis* spp. et ses prédateurs, et toutes se focalisent sur la toxicité d'*O. cf. ovata* vis-à-vis de ses prédateurs. Les résultats de ces expériences réalisées en laboratoire indiquent que la toxicité d'*O. cf. ovata* sur les crustacés est espèce dépendante. Le copépode *Tigriopus fulvus* et l'amphipode *Corophium insidiosum* sont très sensibles à la présence d'*O. cf. ovata* avec des concentrations létales (CL₅₀) en cellules d'*Ostreopsis* comprises entre 10 et 12 cell.mL⁻¹ (Faimali *et al.*, 2012; Prato *et al.*, 2011), alors que le copépode harpacticoïde *Sarsamphiascus cf. propinquus* est nettement plus résistant, avec des CL₅₀ supérieures à 20 000 cell.mL⁻¹ (Pavaux *et al.*, 2019). Des effets reprotoxiques ont été mesurés sur cette dernière espèce avec une baisse de la fécondité et de la fertilité (Pavaux *et al.*, 2020), aussi observée dans le milieu naturel (Guidi-Guilvard *et al.*, 2012). Si la présence de copépodes peut stimuler la production de toxines chez les microalgues du genre *Alexandrium* et *Pseudo-Nitzschia* (Grebner *et al.*, 2019; Selander *et al.*, 2006) ou de la bioluminescence chez *Lingulodinium polyedra* (Prevett *et al.*, 2019), aucune relation de ce type n'a encore été montrée pour *Ostreopsis* spp.

4.2.2.2 Interactions hôtes-parasites chez les dinoflagellés

Les *Chytridiomycota* (souvent appelés chytrides) sont des champignons qui peuvent être des parasites virulents conduisant à de fortes mortalités de leurs hôtes et causant par exemple des changements dans les caractéristiques des communautés phytoplanctoniques (modification de la distribution de taille, promotion d'une stratégie de reproduction de type r^{12} , retard ou inhibition des événements de prolifération) (Frenken *et al.*, 2017). *Ostreopsis* spp. peut être l'hôte du parasite *Dinomyces arenysensis* qui est un chytride appartenant aux Mesochytriales (Lepelletier *et al.*, 2014). Une étude menée en Guadeloupe a montré qu'*Ostreopsis* spp. pouvaient être également parasitées par un dinoflagellé parasitoïde *Amoebophyra* (Boisnoir *et al.*, 2022). Le genre *Ostreopsis* est également sensible à des infections par le parasite *Parvilucifera sinerae* (Garcés *et al.*, 2013) (Figure 26). L'infection des populations d'*Ostreopsis* spp. par ces parasites pourrait avoir un impact significatif sur leur développement dynamique, et constituer ainsi un facteur important de contrôle des proliférations, comme cela a été déjà montré pour d'autres espèces de dinoflagellés (Alves-De-souza *et al.*, 2012; Chambouvet *et al.*, 2008).

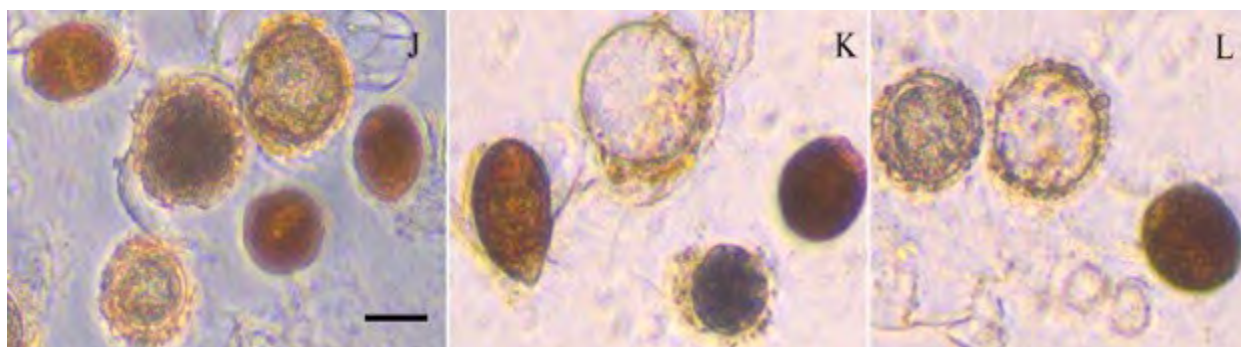


Figure 26 : Cellules d'*O. cf. ovata* infectées par le parasite *Parvilucifera sinerae*

(Source Garcés *et al.*, 2013)

4.2.2.3 Interactions avec les compétiteurs

Les microalgues occupant une niche écologique proche de celle d'*Ostreopsis* peuvent être en compétition avec elle pour les ressources nutritives et/ou pour la lumière. Une diminution de l'abondance des diatomées et des dinoflagellés benthiques est observée *in situ* lors des proliférations d'*O. cf. ovata* (Accoroni *et al.*, 2016a), suggérant une compétition entre ces microorganismes et/ou un effet toxique d'*O. cf. ovata* sur ces microalgues. Des expériences en laboratoire semblent néanmoins montrer que la prolifération d'*O. cf. ovata* a un impact limité sur la croissance et l'adhésion au substrat de deux dinoflagellés *Coolia monotis* et *Prorocentrum minutum* (García-Portela *et al.*, 2016; Monti et Cecchin, 2012; Ternon *et al.*, 2022a). De même, la présence de cellules d'*O. cf. ovata* a un effet modéré sur la croissance des diatomées *Licmophora paradoxa* et *Navicula arenaria* (Ternon *et al.*, 2022a; Ternon *et al.*, 2018). Les ovatoxines produites par *O. cf. ovata* inhibent la croissance de ces deux diatomées à des concentrations de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (mesure effectuées lors de tests *in vitro* en ajoutant des concentrations connues de toxines dans l'eau ;Ternon *et al.*, 2022a). Cependant, de telles

¹² La notion de stratégie r a été élaborée par Mac Arthur et Wilson en 1967.

La stratégie r est une stratégie de développement des populations d'êtres vivants adoptée par des animaux ou des végétaux dont l'habitat est variable ou perturbé, l'approvisionnement en ressources vitales imprévisible et les risques élevés : les espèces misent alors sur la reproduction avec un fort taux de croissance, pour compenser par le nombre. On les appelle des espèces colonisatrices, en expansion ou opportuniste (source www.conservation-nature.fr)

concentrations en toxines dissoutes ne sont jamais rencontrées dans la colonne d'eau des écosystèmes marins ou dans les milieux de culture d'*Ostreopsis*. Ces concentrations pourraient toutefois être atteintes dans les biofilms dans la mesure où ceux-ci concentrent de nombreuses cellules d'*O. cf. ovata* et dans le même temps piège d'autres espèces de microalgues (Ternon *et al.*, 2022a).

Certaines microalgues compétitrices ont le potentiel d'inhiber la croissance d'*O. cf. ovata* via la production de molécules qu'elles relarguent dans le milieu (Pichierri *et al.*, 2017; Ternon *et al.*, 2022a; Ternon *et al.*, 2018). C'est le cas notamment de la diatomée *Licmophora paradoxa* (Ternon *et al.*, 2018) qui produit de petits acides gras issus de la famille des aldéhydes polyinsaturés (communication personnelle, Eva Ternon). Une exposition à plusieurs composés issus de cette famille de molécules cause une déformation des cellules d'*O. cf. ovata*, une baisse de leur motilité, une réduction de leur efficacité photosynthétique, ainsi qu'une perte d'intégrité cellulaire (Pichierri *et al.*, 2017).

4.3 Points à retenir

- *Ostreopsis cf. ovata* se développe préférentiellement à 0,5 mètre de profondeur, à proximité du littoral.
- Le cycle de vie du genre *Ostreopsis cf. ovata* comporte : (i) une phase benthique qui correspond au développement des cellules de microalgues sous forme de biofilm colonisant des substrats biotiques (e.g. macroalgues) ou abiotiques (e.g. galets/rochers) et (ii) une phase planctonique constituée de cellules détachées de leur substrat, migrant dans la colonne d'eau.
- *Ostreopsis cf. ovata* produit un mucus qui conduit à la formation d'agrégats visibles à l'œil nu, que ce soit dans le compartiment benthique ou le compartiment planctonique (coloration brune).
- L'accumulation des agrégats d'*O. cf. ovata* en surface forme des « fleurs d'eau » qui sont souvent associées à des syndromes d'irritation cutanée et respiratoire. Ces fleurs d'eau sont particulièrement présentes au cours de l'après-midi en Méditerranée.
- En méditerranée, les abondances cellulaires d'*O. cf. ovata* dans le compartiment benthique (en nombre de cellule par gramme de poids frais) sont maximales entre 8 et 12h et les abondances cellulaires maximales dans le compartiment planctonique (en nombre de cellules par litre) sont atteintes vers 16h.
- Parmi les nombreux facteurs abiotiques ayant un impact sur le développement d'*Ostreopsis*, un faible hydrodynamisme est déterminant pour le développement et le maintien des biofilms dans le compartiment benthique. Ces microalgues prolifèrent dans des zones à faibles profondeurs et bien éclairées. La température joue également un rôle important, surtout lors de la période des proliférations. L'impact d'autres facteurs, comme la salinité ou les nutriments (azote, phosphore, matière organique) nécessitent des études complémentaires avant de pouvoir conclure sur leurs effets.
- Les connaissances sur les interactions entre *Ostreopsis* et les autres organismes du milieu sont encore trop parcellaires pour permettre d'en tirer des conclusions. Néanmoins, il a été montré que plusieurs espèces benthiques (microalgues, prédateurs de la méiofaune) sont sensibles à *Ostreopsis* lors de proliférations dépassant 20 000 cell.mL⁻¹.

5 Toxines produites par les espèces du genre *Ostreopsis*

À ce jour, le genre *Ostreopsis* comprend douze espèces décrites, dont certaines sont toxigènes et produisent divers composés pouvant présenter un danger pour la santé humaine et la faune marine.

Les principales toxines produites par les espèces d'*Ostreopsis* sont la palytoxine isobare (isob-PLTX)¹³, les ovatoxines (OVTX), les ostréocines (OST) et les mascarénotoxines. Ces composés sont identifiés dans le document comme « les toxines du groupe de la PLTX » car elles présentent toutes une structure chimique proche de celle de la PLTX. En revanche, les microalgues du genre *Ostreopsis* ne produisent pas de PLTX.

D'autres composés toxiques ayant une structure différente de celle du groupe de la PLTX de la palytoxine ont également été identifiés chez *Ostreopsis* spp. C'est le cas notamment de souches coréennes et méditerranéennes d'*O. cf. ovata* qui peuvent produire des ostréols et, des ostréotoxines. Enfin, certaines souches méditerranéennes d'*O. cf. ovata* peuvent produire deux familles de molécules, des liguriatoxines et des riviératoxines, dont les structures et la toxicité sont encore inconnues à ce jour.

Le Tableau IV regroupe les différentes toxines produites par *Ostreopsis* spp. ainsi que les lieux où elles ont été détectées.

Tableau IV : Toxines produites par *Ostreopsis* spp ainsi que les zones géographiques où elles ont été détectées.

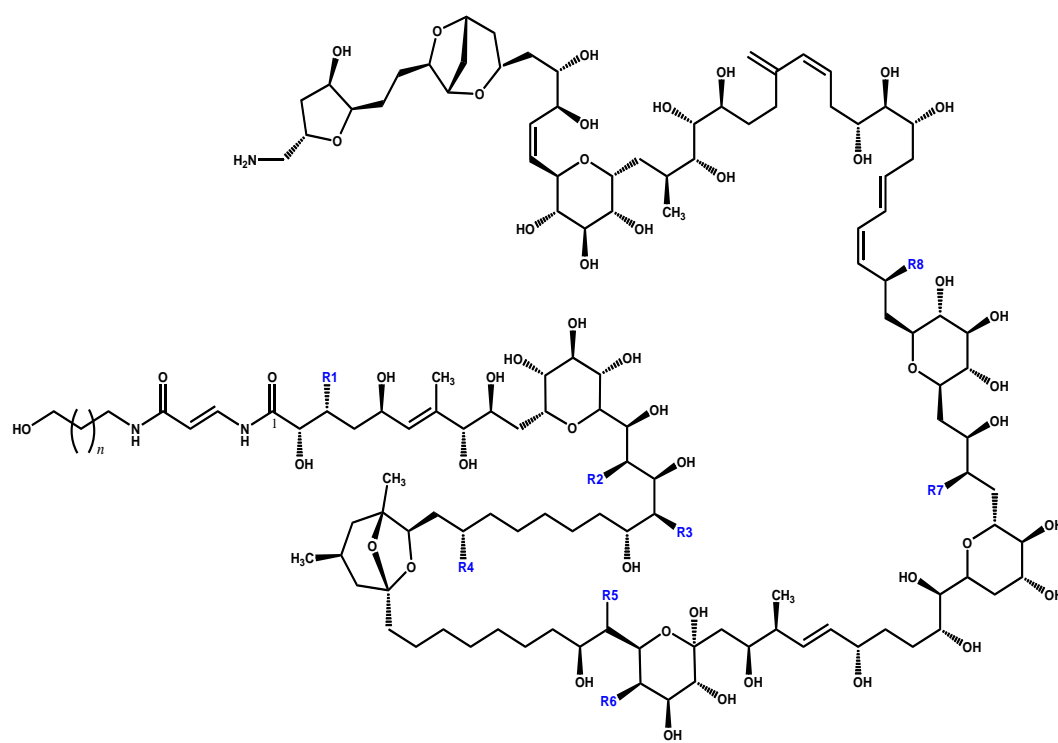
| Toxines | | Organismes | Pays/zone géographique | Références Bibliographiques |
|------------|-----------|-------------------------------|------------------------|---|
| Palytoxine | | <i>Ostreopsis</i> sp. | Japon | (Taniyama <i>et al.</i> , 2003) |
| | Isob-PLTX | <i>Ostreopsis cf. ovata</i> | Italie | (Ciminiello <i>et al.</i> , 2006) |
| Ovatoxines | OVTX-a | <i>Ostreopsis cf. ovata</i> | Méditerranée N.O | (Ciminiello <i>et al.</i> , 2012a) |
| | OVTX-b | <i>Ostreopsis cf. ovata</i> | Méditerranée N.O | (Ciminiello <i>et al.</i> , 2010) |
| | OVTX-c | <i>Ostreopsis cf. ovata</i> | Méditerranée N.O | (Ciminiello <i>et al.</i> , 2010) |
| | OVTX-d | <i>Ostreopsis cf. ovata</i> | Méditerranée N.O | (Ciminiello <i>et al.</i> , 2010) |
| | OVTX-e | <i>Ostreopsis cf. ovata</i> | Méditerranée N.O | (Ciminiello <i>et al.</i> , 2010) |
| | OVTX-f | <i>Ostreopsis cf. ovata</i> | Méditerranée N.O | (Ciminiello <i>et al.</i> , 2012b) |
| | OVTX-g | <i>Ostreopsis cf. ovata</i> | Méditerranée N.O | (García-Altare <i>et al.</i> , 2015) |
| | OVTX-h | <i>Ostreopsis cf. ovata</i> | Méditerranée N.O | (Brissard <i>et al.</i> , 2015) |
| | OVTX-i | <i>Ostreopsis fattorussoi</i> | Chypre | (Tartaglione <i>et al.</i> , 2016b ; Gu <i>et al.</i> , 2022) |
| | OVTX-j1 | <i>Ostreopsis fattorussoi</i> | Chypre | (Tartaglione <i>et al.</i> , 2016b ; Gu <i>et al.</i> , 2022) |
| | OVTX-j2 | <i>Ostreopsis fattorussoi</i> | Chypre | (Tartaglione <i>et al.</i> , 2016b ; Gu <i>et al.</i> , 2022) |
| | OVTX-k | <i>Ostreopsis fattorussoi</i> | Chypre | (Tartaglione <i>et al.</i> , 2016b) |
| | OVTX-l | <i>Ostreopsis cf. ovata</i> | Italie | (Tartaglione <i>et al.</i> , 2017) |
| | OVTX-a AC | <i>Ostreopsis</i> sp. | Japon | (Suzuki <i>et al.</i> , 2012) |

¹³ Il s'agit d'un isomère de la PLTX, de même formule brute mais ayant une formule développée différente.

| Toxines | Organismes | Pays/zone géographique | Références Bibliographiques | |
|-----------------|------------|------------------------------------|-----------------------------|--|
| | OVTX-b AC | <i>Ostreopsis</i> sp. | Japon | (Suzuki <i>et al.</i> , 2012) |
| | OVTX-d AC | <i>Ostreopsis</i> sp. | Japon | (Suzuki <i>et al.</i> , 2012) |
| | OVTX-e AC | <i>Ostreopsis</i> sp. | Japon | (Suzuki <i>et al.</i> , 2012) |
| | OVTX-a IK2 | <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i> | Japon | (Uchida, Taira et Yasumoto, 2013) |
| | OVTX-d IK2 | <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i> | Japon | (Uchida, Taira et Yasumoto, 2013) |
| | OVTX-e IK2 | <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i> | Japon | (Uchida, Taira et Yasumoto, 2013) |
| Ostréocines | OST-A | | | |
| | OST-B | <i>Ostreopsis siamensis</i> | Japon | (Ukena <i>et al.</i> , 2001) |
| | OST-D | <i>Ostreopsis siamensis</i> | Japon | (Usami <i>et al.</i> , 1995) |
| | OST-E1 | | | |
| Mascarénotoxine | McTX-a | <i>Ostreopsis mascarenensis</i> | Iles Rodrigues | (Lenoir <i>et al.</i> , 2004; Lenoir <i>et al.</i> , 2006) |
| | McTX-b | <i>Ostreopsis mascarenensis</i> | Iles Rodrigues | (Lenoir <i>et al.</i> , 2004; Lenoir <i>et al.</i> , 2006) |
| | McTX-c | <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i> | Italie | (Rossi <i>et al.</i> , 2010) |
| Ostréols | Ostreol-A | <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i> | Corée | (Hwang <i>et al.</i> , 2013) |
| | Ostreol-B | <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i> | Corée | (Hwang <i>et al.</i> , 2018) |
| Liguriatoxines | LGTX-A | <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i> | France, Méditerranée | (Ternon <i>et al.</i> , 2022b) |
| | LGTX-B | <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i> | France, Méditerranée | (Ternon <i>et al.</i> , 2022b) |
| | LGTX-C | <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i> | France, Méditerranée | (Ternon <i>et al.</i> , 2022b) |
| Riviéراتoxines | RVTX-A | <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i> | France, Méditerranée | (Ternon <i>et al.</i> , 2022b) |
| | RVTX-B | <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i> | France, Méditerranée | (Ternon <i>et al.</i> , 2022b) |
| | RVTX-C | <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i> | France, Méditerranée | (Ternon <i>et al.</i> , 2022b) |

5.1 Description et structure chimique de la palytoxine

La palytoxine a été isolée pour la première fois en 1971 à partir du cnidaire hexacoralliaire *Palythoa toxica* (corail tropical) (Moore et Scheuer, 1971). Sa structure a été caractérisée élucidée par rayons-X et résonance magnétique nucléaire (RMN) (Moore et Bartolini, 1981; Uemura *et al.*, 1981a, 1981b). Quatre analogues structuraux présents en quantité moindre que la PLTX ont également été isolés à partir de *Palythoa tuberculosa* : homo-palytoxine, bishomo-palytoxine, néo-palytoxine et déoxy-palytoxine (Uemura *et al.*, 1985), ainsi que la 42-hydroxy-palytoxine (Ciminiello *et al.*, 2009a), dont la structure a été déterminée à partir des échantillons de *Palythoa tuberculosa* et de *Palythoa toxica* prélevés au large de la côte hawaïenne (Figure 27).



| Toxines | n | R1 | R2 | R3 | R4 | R5 | R6 | R7 | R8 |
|--------------------|---|-----------------|----|----|-----------------|----|----|----|----|
| Palytoxine | 1 | CH ₃ | OH | OH | CH ₃ | H | OH | OH | OH |
| Homo-palytoxine | 2 | CH ₃ | OH | OH | CH ₃ | H | OH | OH | OH |
| Bishomo-palytoxine | 3 | CH ₃ | OH | OH | CH ₃ | H | OH | OH | OH |
| Neo-palytoxine | 1 | | OH | OH | CH ₃ | H | OH | OH | OH |
| Deoxy-palytoxine | 1 | CH ₃ | OH | OH | CH ₃ | H | OH | OH | H |
| 42-OH-palytoxine | 1 | CH ₃ | OH | OH | CH ₃ | OH | OH | OH | OH |
| Ostreocine-D | 1 | H | OH | H | H | OH | H | OH | OH |
| Ovatoxine-a | 1 | CH ₃ | H | OH | CH ₃ | OH | OH | H | OH |

Figure 27 : Structure de la palytoxine et de ses analogues dont la structure chimique est connue

La PLTX est une molécule non protéique de masse molaire élevée (2680 Da), de formule brute C₁₂₉H₂₂₃N₃O₅₄. Elle est composée d'une longue chaîne aliphatique, partiellement insaturée, comprenant de nombreux éthers cycliques (polyéther), deux fonctions amides et 42 groupements hydroxyles, ainsi que la présence d'une fonction amine primaire qui confère à la molécule un caractère basique. La PLTX se caractérise par un spectre d'adsorption ultraviolet (UV) avec deux maxima d'absorption à 233 et 263 nm dus à la présence de deux groupements chromophores (Riobó, Paz et Franco, 2006). En spectrométrie de masse, la fragmentation en C8-C9 de la molécule produit un ion fragment majoritaire et caractéristique, appelé fragment A correspondant à un rapport masse sur charge (m/z) de 327 (Ciminiello *et al.*, 2006) (Figure 27).

La PLTX est un composé hygroscopique (absorption de l'humidité de l'air), amorphe, blanc et qui n'a jamais pu être cristallisé. Son point de fusion n'est pas connu. Elle serait très résistante à la chaleur, et brûle au-delà de 300°C (Katikou et Vlamis, 2014). La PLTX est insoluble dans les solvants apolaires ou peu polaires (ex chloroforme, éther, acétone), moyennement soluble dans le méthanol et l'éthanol, et soluble dans la pyridine, le diméthylesulfoxyde, l'eau (Katikou et Vlamis, 2014) et le méthanol aqueux (Amzil *et al.*, 2012; Ciminiello *et al.*, 2011a). La PLTX a été trouvée également sous forme de dimère par interaction électrostatique (Inuzuka, Uemura et Arimoto, 2008; Mazzeo *et al.*, 2021).

La PLTX et ses analogues seraient synthétisés par des bactéries (Moore, Helfrich et Patterson 1982; Seemann *et al.*, 2009) et des microalgues symbiontes du corail *Palythoa* (Maeda *et al.* 1985). Par ailleurs, la PLTX et la 42-hydroxy-PLTX ont été détectées chez *Trichodesmium* sp., une cyanobactérie marine tropicale (Kerbrat *et al.*, 2011).

Pour permettre les études sur la PLTX, des efforts en chimie de synthèse ont été réalisés dans les années 90 dans le but de produire un étalon analytique certifié. Ces essais ont abouti à un composé similaire à la molécule naturelle isolée de *Palythoa tuberculosa* par comparaison de leur activité biologique, leur comportement chromatographique et leurs données spectrométriques (Armstrong *et al.*, 1989; Suh et Kishi, 1994). Toutefois, la taille et la complexité de la PLTX nécessite un processus de synthèse d'environ 65 étapes qui est très lent et onéreux (Katikou, 2007). À ce jour, un étalon analytique non certifié de PLTX existe et est isolé à partir de coraux du genre *Palythoa*.

La PLTX a été recherchée dans les extraits d'*Ostreopsis* cf. *ovata* (Ciminiello *et al.*, 2006; Taniyama *et al.*, 2003) par des méthodes de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse basse résolution (LC-MS/MS). Un analogue de la PLTX a ainsi été détecté chez *O.* cf. *ovata* (Ciminiello *et al.*, 2006; Taniyama *et al.*, 2003), nommé initialement « putative PLTX » (pPLTX) puis « PLTX isobare » (isob-PLTX) après confirmation de sa structure par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (LC-HRMS/MS) (García-Altare *et al.*, 2015). La PLTX-isob présente une structure très similaire à la PLTX avec deux atomes d'oxygène placés sur des positions différentes. De nombreux analogues de la PLTX ont ensuite été décrits chez les espèces du genre *Ostreopsis* (Brissard *et al.*, 2014; Ciminiello *et al.*, 2008a; García-Altare *et al.*, 2015).

Les progrès de techniques utilisant la spectrométrie de masse haute résolution et la RMN ont révélé une grande diversité des analogues de PLTX. Sur la base du squelette structural de la Figure 27, le tableau V présente quelques caractéristiques de la palytoxine et de ses analogues (ovatoxines, ostréocines et mascarénotoxines) (Gémin *et al.*, 2020).

5.2 Toxines du groupe de la PLTX produites par *Ostreopsis* spp.

Parmi les douze espèces décrites dans le genre *Ostreopsis* (Guiry et Guiry, 2022), les espèces *O. siamensis*, *O. mascarenensis*, *O.* cf. *ovata* et *O. fattorussoi* produisent certaines des toxines du groupe de la PLTX : isob-PLTX, les ostréocines, les mascarénotoxines et les ovatoxines (Figure 28).

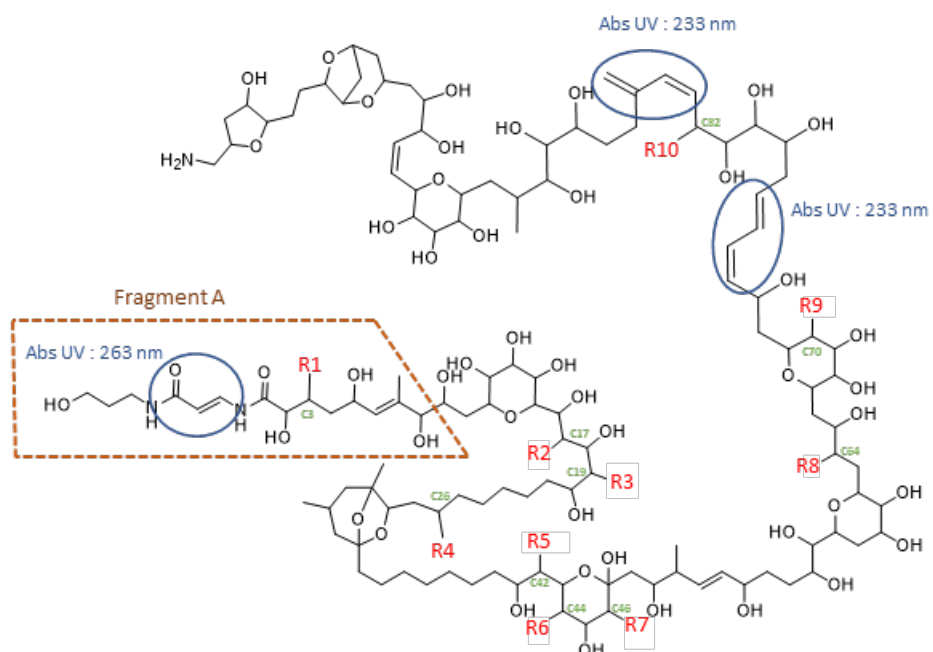


Figure 28 : Structure de la palytoxine avec ses sites d'absorbance à 233 et 263 nm (en bleu), le fragment A (en marron) et la position des modifications chimiques par rapport à ses analogues (en rouge) retrouvés chez *Ostreopsis* spp

(Source Gémin *et al.*, 2020).

Tableau V : Toxines du groupe de la PLTX (PLTX, ovatoxines, ostréocines et mascarénotoxines) retrouvés chez *Palythoa toxica* et chez différentes espèces d'*Ostreopsis* : formule brute, masse molaire (théorique) et positions suspectées des modifications chimiques (annotées R1 à R10 sur la Figure 27). Seule la structure de l'ovatoxine-a et l'Ostreocine-D sont élucidée par RMN à partir de toxines pures. Pour les autres analogues, il s'agit d'hypothèses de structures à partir de formules brutes.

| Toxine | Formule brute | Masse molaire théorique (g/mol) | R1 (C ₃) | R2 (C ₁₇) | R3 (C ₁₉) | R4 (C ₂₆) | R5 (C ₄₂) | R6 (C ₄₄) | R7 (C ₄₆) | R8 (C ₆₄) | R9 (C ₇₀) | R10 (C ₈₂) | Autres modifications par rapport à la PLTX | Références | |
|--|---|---------------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|---|--|---|
| <i>Palythoa toxica</i> | | | | | | | | | | | | | | | |
| Palytoxine 42-Hydroxy- Palytoxine | C ₁₂₉ H ₂₂₃ O ₅₄ N ₃ | 2680 | Me | OH | OH | Me | H | OH | OH | OH | OH | OH | H | - | (Uemura <i>et al.</i> 1981a, 1981b) (Ciminiello <i>et al.</i> 2009b) |
| | C ₁₂₉ H ₂₂₃ O ₅₅ N ₃ | 2696 | Me | OH | OH | Me | OH | OH | OH | OH | OH | OH | H | | |
| <i>Ostreopsis cf. ovata et O. fattorussoi</i> | | | | | | | | | | | | | | | |
| Palytoxine isobare | C ₁₂₉ H ₂₂₃ O ₅₄ N ₃ | 2680 | Me | H | OH | Me | OH | OH | OH | H | OH | H | + O (fragment A ou C ₁ - C ₈ fragment B) | (García-Altare <i>et al.</i> , 2015) | |
| Ovatoxine-a | C ₁₂₉ H ₂₂₃ O ₅₂ N ₃ | 2648 | Me | H | OH | Me | OH | H | OH | H | OH | H | - | (Ciminiello <i>et al.</i> , 2008b; Ciminiello <i>et al.</i> , 2012a; Ciminiello <i>et al.</i> , 2012b) | |
| Ovatoxine-b | C ₁₃₁ H ₂₂₇ O ₅₃ N ₃ | 2692 | Me | H | OH | Me | OH | H | OH | H | OH | H | + C ₂ H ₄ O (fragment A) | (Ciminiello <i>et al.</i> , 2010) | |
| Ovatoxine-c | C ₁₃₁ H ₂₂₇ O ₅₄ N ₃ | 2708 | Me | H | OH | Me | OH | H | OH | H | OH | H | + C ₂ H ₄ O (fragment A) | (Ciminiello <i>et al.</i> , 2010) | |
| Ovatoxine-d | C ₁₂₉ H ₂₂₃ O ₅₃ N ₃ | 2664 | Me | H | OH | Me | OH | H | OH | H | OH | H | + O (fragment B) | (Ciminiello <i>et al.</i> , 2010) | |
| Ovatoxine-e | C ₁₂₉ H ₂₂₃ O ₅₃ N ₃ | 2664 | Me | H | OH | Me | OH | H | OH | H | OH | H | + O (fragment A) | (Ciminiello <i>et al.</i> , 2010) | |
| Ovatoxine-f | C ₁₃₁ H ₂₂₇ O ₅₂ N ₃ | 2676 | Me | H | OH | Me | OH | H | OH | H | OH | H | + C ₂ H ₄ (C ₉₅ -C ₁₀₂) | (Ciminiello <i>et al.</i> , 2012b) | |
| Ovatoxine-g | C ₁₂₉ H ₂₂₃ O ₅₁ N ₃ | 2632 | Me | H | OH | Me | OH | H | H | H | OH | H | - | (García-Altare <i>et al.</i> , 2015) | |
| Ovatoxine-h | C ₁₂₉ H ₂₂₅ O ₅₁ N ₃ | 2634 | Me | H | OH | Me | OH | H | OH | H | OH | H | - O + 2H (C ₄₂ -C ₄₉) | (Brissard <i>et al.</i> , 2015) | |
| Ovatoxine-i | C ₁₃₁ H ₂₂₅ O ₅₃ N ₃ | 2690 | Me | H | OH | Me | OH | H | OH | H | OH | H | + C ₂ H ₂ O ₂ (C ₄₉ -C ₅₂) + 1 insaturation (C ₄₉ -C ₅₂) - O (C ₅₃ -C ₇₈) | (Tartaglione <i>et al.</i> , 2016b) | |
| Ovatoxine-j1 | C ₁₃₁ H ₂₂₅ O ₅₄ N ₃ | 2706 | Me | H | OH | Me | OH | OH | OH | H | OH | H | + C ₂ H ₂ O ₂ (C ₄₉ -C ₅₂) + 1 insaturation (C ₄₉ -C ₅₂) - O (C ₅₃ -C ₇₈) | (Tartaglione <i>et al.</i> , 2016b) | |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|---|------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|--|---|
| Ovatoxine-j2 | C ₁₃₁ H ₂₂₅ O ₅₄ N ₃ | 2706 | Me | H | OH | Me | OH | H | OH | H | OH | H | + C ₂ H ₂ O ₂ (C ₄₉ -C ₅₂) + 1 insaturation (C ₄₉ -C ₅₂) | (Tartaglione <i>et al.</i> , 2016b) |
| Ovatoxine-k | C ₁₃₁ H ₂₂₅ O ₅₅ N ₃ | 2722 | Me | H | OH | Me | OH | OH | OH | H | OH | H | + C ₂ H ₂ O ₂ (C ₄₉ -C ₅₂) + 1 insaturation (C ₄₉ -C ₅₂) | (Tartaglione <i>et al.</i> , 2016b) |
| Ovatoxine-l | C ₁₃₀ H ₂₂₅ O ₅₂ N ₃ | 2659 | ND | | | | | | | | | | | (Tartaglione <i>et al.</i> , 2017) |
| Ovatoxine-a AC | C ₁₂₉ H ₂₂₃ O ₅₂ N ₃ | 2648 | Me | OH | OH | Me | OH | H | OH | OH | OH | H | - O (C ₁₆ -C ₂₀) - O (C ₂₀ - C ₇₃) | (Suzuki <i>et al.</i> , 2012) |
| Ovatoxine-b AC | C ₁₃₁ H ₂₂₇ O ₅₃ N ₃ | 2692 | ND | | | | | | | | | | | (Suzuki <i>et al.</i> , 2012) |
| Ovatoxine-d AC | C ₁₂₉ H ₂₂₃ O ₅₃ N ₃ | 2664 | ND | | | | | | | | | | | (Suzuki <i>et al.</i> , 2012) |
| Ovatoxine-e AC | C ₁₂₉ H ₂₂₃ O ₅₃ N ₃ | 2664 | ND | | | | | | | | | | | (Suzuki <i>et al.</i> , 2012) |
| Ovatoxine-a IK2 | C ₁₂₉ H ₂₂₃ O ₅₂ N ₃ | 2648 | Me | H | OH | Me | OH | H | OH | OH | H | H | - | (Uchida, Taira et Yasumoto, 2013) |
| Ovatoxine-d IK2 | C ₁₂₉ H ₂₂₃ O ₅₃ N ₃ | 2664 | Me | H | OH | Me | OH | OH | OH | OH | H | H | - | (Uchida, Taira et Yasumoto, 2013) |
| Ovatoxine-e IK2 | C ₁₂₉ H ₂₂₃ O ₅₃ N ₃ | 2664 | Me | OH | OH | Me | OH | OH | OH | OH | H | OH | - | (Uchida, Taira et Yasumoto, 2013) |
| <i>Ostreopsis cf. siamensis</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| Ostréocine-A | C ₁₂₇ H ₂₁₉ O ₅₄ N ₃ | 2652 | H | OH | H | H | OH | H | OH | OH | OH | OH | - | (Terajima <i>et al.</i> , 2019) |
| Ostréocine-B | C ₁₂₇ H ₂₁₉ O ₅₄ N ₃ | 2652 | H | OH | H | H | OH | OH | OH | OH | OH | H | - | (Terajima <i>et al.</i> , 2018) |
| Ostréocine-D | C ₁₂₇ H ₂₁₉ O ₅₃ N ₃ | 2636 | H | OH | H | H | OH | H | OH | OH | OH | H | - | (Ukena <i>et al.</i> , 2002; Ukena <i>et al.</i> , 2001; Usami <i>et al.</i> , 1995) |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---------------------------------|------|----|----|---|---|----|---|----|----|--|---|--|---------------------------------|
| Ostréocine-E1 | $C_{127}H_{217}$ $O_{52}N_3$ | 2618 | H | OH | H | H | OH | H | OH | OH | OH | H | - | (Terajima <i>et al.</i> , 2019) |
| <i>Ostreopsis cf. ovata et O. mascarenensis</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| Mascarénotoxine-a | $C_{127}H_{221}$ $O_{50}N_3$ | 2590 | ND | | | | | | | | | | (Lenoir <i>et al.</i> , 2004; Lenoir <i>et al.</i> , 2006; Rossi <i>et al.</i> , 2010) | |
| Mascarénotoxine-b | ND | | | | | | | | | | (Lenoir <i>et al.</i> , 2004; Lenoir <i>et al.</i> , 2006) | | | |
| Mascarénotoxine-c | $C_{129}H_{221}$ $O_{51}N_3$ | 2630 | | | | | | | ND | | | | | (Rossi <i>et al.</i> , 2010) |

– ND : non déterminé, cellules grisée : ; tirait : Pas de formule brute proposée; Note : il s'agit de structures hypothétiques – Source : Gémin *et al.*, 2020).

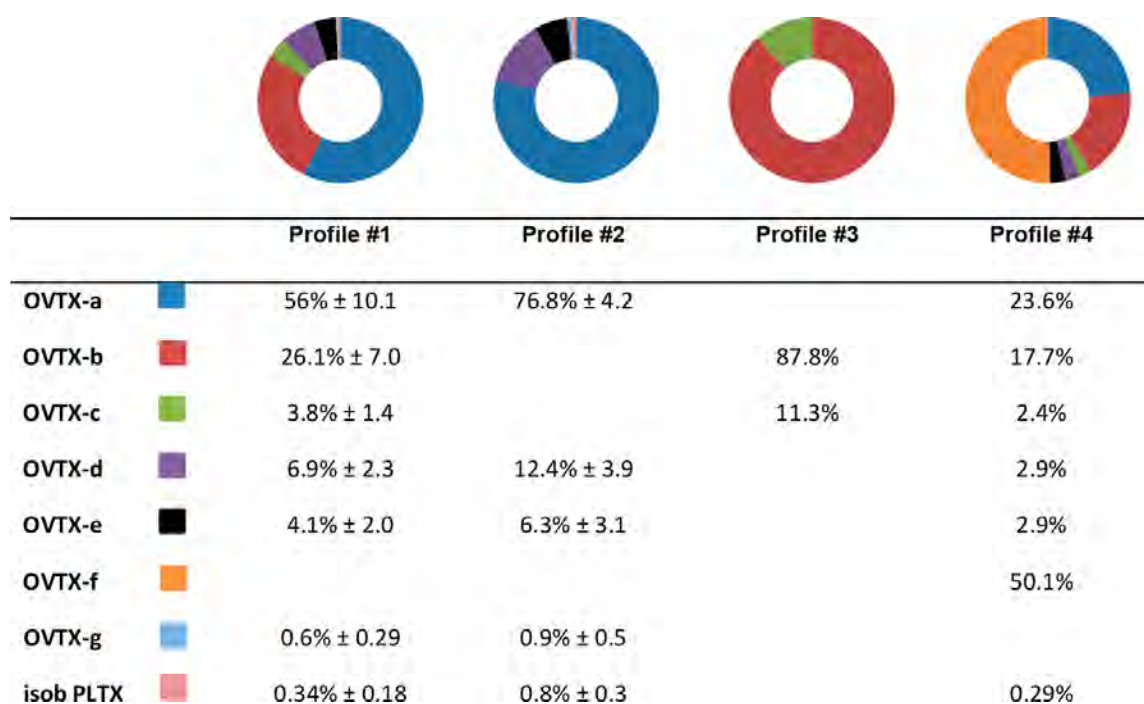
5.2.1 Ovatoxines et isob-PLTX

La famille des ovatoxines (OVTX) regroupe plusieurs analogues de la PLTX et son nom provient de l'espèce qui les produit, *Ostreopsis cf. ovata*. Cette famille de molécules a été décrite pour la première fois en Méditerranée dans les années 2000 à la suite de proliférations toxiques du dinoflagellé *O. cf. ovata* (Ciminiello *et al.*, 2006). Sur la base des profils LC-HRMS/MS, ces composés ont été identifiés comme étant des analogues de la PLTX (Ciminiello *et al.*, 2012a ; Ciminiello *et al.*, 2006 ; Ciminiello *et al.*, 2008a ; Ciminiello *et al.*, 2012b). Les analyses physico-chimiques en LC-MS/MS ont suggéré qu'*O. cf. ovata* produisait deux analogues de la PLTX : l'isob-PLTX et une nouvelle molécule, l'ovatoxine-a (OVTX-a) (Ciminiello *et al.*, 2008b), dont la structure complète a été élucidée par spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) et Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) (Ciminiello *et al.*, 2012a) (Figure 27). L'OVTX-a a une masse moléculaire de 2648 Da avec pour formule brute C₁₂₉H₂₂₃O₅₂N₃, et présente une structure très similaire à celle de la PLTX avec deux atomes d'oxygène en moins.

Depuis 2010, d'autres membres de la famille des OVTX ont été caractérisés dans les souches méditerranéennes d'*O. cf. ovata* : OVTX-b, -c, -d et -e (Ciminiello *et al.*, 2010) OVTX-f (Ciminiello *et al.*, 2012b), OVTX-g (García-Altare *et al.*, 2015), OVTX-h (Brissard *et al.*, 2015) et enfin l'OVTX-i (Tartaglione *et al.*, 2017). L'analyse du profil toxinique d'une cinquantaine de souches méditerranéennes d'*O. cf. ovata* en culture indique une variabilité qualitative et quantitative intra-spécifique du contenu en toxines (Tableau VI) (Tartaglione *et al.*, 2017). À l'exception d'une seule souche, toutes les autres souches d'*O. cf. ovata* produisent des OVTX : 67 % des souches produisent OVTX-a à -e, OVTX-g, et isob-PLTX (Profile #1 dans le tableau 5) ; 25 % produisent des OVTX-a, -d, -e et isob-PLTX (Profile #2 dans le tableau 5) ; 4 % produisent OVTX-b et -c (Profile #3 dans le tableau 5) ; une seule souche a un profil composé d'OVTX-a à f, avec une dominance de l'OVTX-f, et isob-PLTX (Profile #4 dans le tableau 5). L'analogue OVTX-i a été détecté dans 36 souches. La concentration en toxines varie de 4 à 70 pg.cell⁻¹.

En dehors de l'OVTX-a (Ciminiello *et al.*, 2012a), aucune structure chimique complète des autres analogues d'OVTX, retrouvés chez les espèces du genre *Ostreopsis*, n'a été élucidée ; seules les fragmentations par spectrométrie de masse haute résolution ont permis de formuler des hypothèses de structures. Comme pour la PLTX, la fragmentation en C8-C9 de la molécule des OVTX produit un ion fragment majoritaire dont le rapport masse sur charge (m/z) est de 327. Néanmoins, l'absence de cet ion fragment n'exclut pas l'appartenance au groupe PLTX d'une molécule, car il pourrait être le résultat de différences structurelles au niveau du fragment A de la molécule (Figure 27). En effet, cet ion fragment A a une m/z de 327 pour la isob-PLTX, l'OVTX-a, l'OVTX-d et l'OVTX-f ; tandis que pour l'OVTX-b et l'OVTX-c, l'ion fragment A a une m/z de 371 et de 343 pour l'OVTX-e.

Tableau VI : Abondance relative des ovatoxines (OVTX) et de la palytoxine isobare (isob-PLTX) dans les profils toxiques des souches d'*O. cf. ovata* prélevées en Méditerranée



(Source Tartaglione *et al.*, 2017)

D'autres OVTX ont été identifiées, OVTX-i, j1, j2 et k, chez *O. fattorussoi*, isolée sur les côtes libanaises et chypriotes (Accoroni *et al.*, 2016a; Tartaglione *et al.*, 2016b) ainsi que dans des souches *O. cf. ovata* asiatiques (Gu *et al.*, 2022). Des isomères des OVTX méditerranéennes (OVTX-a, -b, -d, -e) ont été identifiés dans des souches japonaises d'*Ostreopsis*, et nommés OVTX-a AC, -b AC, -d AC et -e AC (Suzuki *et al.*, 2012) car provenant de cultures fournies par Adachi Masao, ainsi que les OVTX-a IK2, -d IK2 et -e IK2 (Uchida, Taira et Yasumoto, 2013) issues de souches originaires de l'île d'Ikei (Okinawa, Japon) (Tableau VI).

5.2.2 Ostrécocines

Les ostrécocines (OST) ont été identifiées chez l'espèce tropicale *Ostreopsis siamensis* (Terajima *et al.*, 2018, 2019; Ukena *et al.*, 2002; Ukena *et al.*, 2001; Usami *et al.*, 1995). Usami *et al.* (1995) ont été les premiers à élucider la structure de l'ostrécocine-D (OST-D) et ont rapporté une ressemblance de ses propriétés structurales et chimiques avec celles de la PLTX (Figure 28). Elle est décrite comme étant la 42-hydroxy-3,26-didéméthyl-19,44didésoxypalytoxine. L'OST-D est un composé solide amorphe incolore, possédant une activité optique et un spectre d'absorption UV présentant deux maxima d'absorption à 234 et 263 nm. Sa formule brute est C₁₂₇H₂₁₉N₃O₅₃, et sa masse moléculaire est de 2636 Da. L'absorption UV ainsi que les spectres RMN indiquent que l'OST-D a une fonctionnalité diène et cétone conjuguée, analogue à la PLTX (Usami *et al.*, 1995).

Parmi les OST produites par cette microalgue (OST-A, -B, -D et -E1), seule l'OST-D a été étudiée en détail. L'OST-B est l'une des autres molécules du groupe de la PLTX également

détectée dans une culture japonaise d'*O. siamensis*. À défaut d'une quantité suffisante de composé, sa structure complète n'a pas pu être élucidée par RMN, ce qui a conduit à proposer une structure provisoire (Ukena *et al.*, 2001). L'OST-B présente un hydroxyle supplémentaire en C-44 et elle est décrite comme étant la 42-hydroxy-3, 26-didéméthyl-19-désoxypalytoxine. Sa formule brute est $C_{127}H_{219}N_3O_{54}$ et sa masse moléculaire est de 2651 Da. La fragmentation entre C-8 et C-9 de la molécule, qui est typique de tous les analogues de la PLTX connus, produit un fragment A de $C_{15}H_{26}N_2O_6$ avec un ion caractéristique [fragment A + H - H₂O]⁺ à m/z 313.

5.2.3 Mascarénotoxines (McTX)

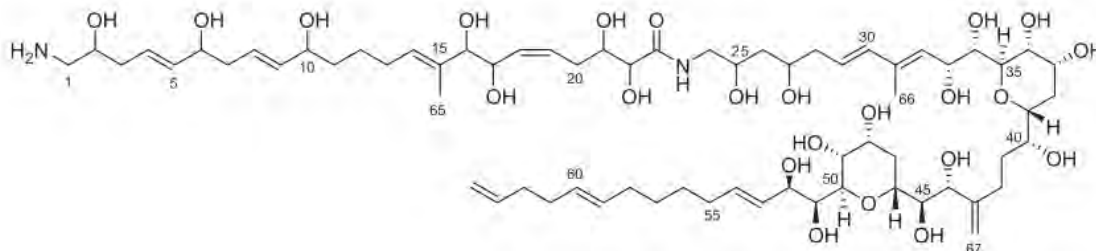
Les mascarénotoxines (McTX-a, -b, -c) sont produites par l'espèce tropicale *Ostreopsis mascarenensis* et peuvent également être produites par *O. cf. ovata* (Rossi *et al.*, 2010). *O. mascarenensis* a d'abord été identifiée dans les récifs coralliens peu profonds du sud-ouest de l'océan Indien (Quod, 1994). McTX-a et McTX-b ont été mises en évidence par chromatographie liquide couplée à un détecteur UV (LC-UV ; maximum d'absorbance UV caractéristiques à 233 et 263 nm) par comparaison avec le spectre UV de l'étalon de PLTX et grâce à l'ion fragment caractéristique m/z 327 ; cependant, la structure chimique de ces composés n'a pas encore été élucidée (Lenoir *et al.*, 2004; Lenoir *et al.*, 2006). Les profils de spectres de masses et le type de fragmentation des deux McTX purifiées, obtenus par LC-HRMS, sont similaires à ceux de la PLTX, mais avec une masse moléculaire se situant entre 2500 et 2535 Da, inférieure à celle de la PLTX (2680 Da). Les formules brutes et les masses moléculaires ont finalement été déterminés pour McTX-a (2590 Da) et McTX-c (2630 Da) à partir d'une culture d'*O. cf. ovata* (Rossi *et al.*, 2010).

5.3 Autres toxines produites par *Ostreopsis* spp.

5.3.1 Ostréols

Une nouvelle famille de métabolites toxiques polyhydroxylés nommés ostréols a été isolée de souches coréennes d'*O. cf. ovata*. À ce jour, deux membres de cette famille ont été décrits, ostréol-A (Hwang *et al.*, 2013) et ostréol-B (Hwang *et al.*, 2018), dont les structures ont été totalement élucidées (Figure 29). Ces deux composés ont une masse molaire plus faible (1334 g.mol⁻¹ et 1154 g.mol⁻¹) que les analogues de la PLTX.

A



B

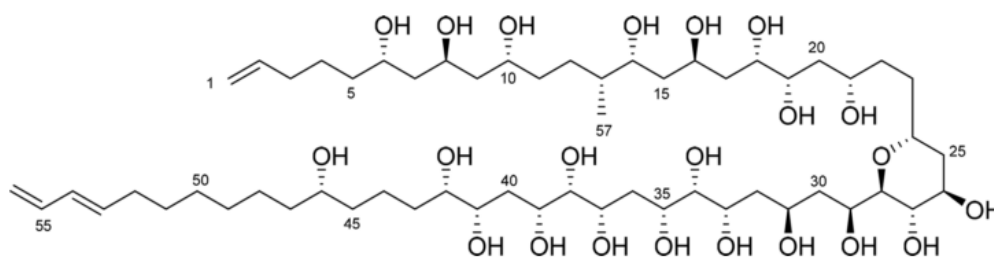


Figure 29 : (A) Structure chimique de l'ostréol-A ; (B) de l'ostréol-B

(Source Hwang *et al.*, 2018; Hwang *et al.*, 2013)

5.3.2 Ostréotoxines

La famille des ostréotoxines (OTX-1, OTX-3) a été associée initialement à l'espèce *O. lenticularis* (Mercado *et al.*, 1994a) sur la base d'examen en microscopie optique (Fukuyo, 1981). Récemment en utilisant des outils moléculaires, Chomérat *et al.* (2019) ont montré que 47 souches d'*O. lenticularis*, isolées de quatre régions différentes de la Polynésie française, appartiennent à un génotype unique. Il s'est avéré qu'après analyses (LC-MS/MS et Neuro2A) qu'aucune de ses souches n'est capable de produire des OTX ni ne présente de toxicité, suggérant qu'une autre espèce serait à l'origine de la production des OTX.

5.3.3 Liguriatoxines et riviératoxines

Très récemment, deux nouveaux groupes de toxines ont été isolés à partir d'une souche méditerranéenne d'*O. cf. ovata* (Ternon *et al.*, 2022b). Ces deux familles de toxines ont été nommées liguriatoxines (LGTX) et riviératoxines (RVTX) mais les structures n'ont pas pu être élucidées à défaut d'une quantité suffisante de composés purs. Les données acquises en LC-HRMS/MS suggèrent qu'il ne s'agit pas de composés analogues à la PLTX car aucun ne possède les fragments typiques en C8-C9 qui produisent un ion fragment majoritaire m/z 327, 371 ou 343. Les structures moléculaires de ces composés n'ont pas encore été déterminées.

5.4 Toxines produites les espèces d'*Ostreopsis* présentes sur la côte basque

Lors de l'épisode de prolifération d'*Ostreopsis* en août 2021 sur la côte basque (Saint-Jean-de-Luz), les investigations menées par l'Ifremer ont mis en évidence la présence de deux espèces de microalgues du genre *Ostreopsis* : *O. cf. siamensis* et *O. cf. ovata*. La recherche ciblée de la PLTX et de ses analogues par LC-MS/MS (PLTX, OVTX, OST, McTX) dans des cellules d'*Ostreopsis* prélevées *in situ* et cultivées (*O. cf. siamensis* et *O. cf. ovata*) a mis en évidence la présence des ovatoxines (OVTX-a, -b, -c, -d) dans l'échantillon prélevé *in situ* et dans les cellules d'*O. cf. ovata* cultivées (Amzil *et al.*, 2021).

L'absence des toxines du groupe de la PLTX dans l'extrait issu des cultures de *O. cf. siamensis* est en accord avec les résultats de Ciminiello *et al.* (2013) qui montrent que plusieurs souches d'*O. cf. siamensis* provenant de Méditerranée (Sicile, Italie) et d'Atlantique (Sines et Cascais, Portugal) ne produisent pas d'OST et d'OVTX. Les OVTX sont produites par les souches méditerranéennes d'*O. cf. ovata*. Des concentrations inférieures au femtogramme (fg) de isob-PLTX par cellule ont été détectés par LC-MS/MS dans la seule souche méditerranéenne (Taormina, Italie) (Ciminiello *et al.*, 2013). Les auteurs concluent que ces souches sont dépourvues de toxicité appréciable.

5.5 Points à retenir

- Les espèces du genre *Ostreopsis* produisent des toxines dont la structure moléculaire est très proche de la PLTX ; c'est le cas des OVTX, des OST et des McTX. Ces toxines sont identifiées dans le document sous le nom de « toxines du groupe de la PLTX ».
- Des ovatoxines (OVTX-a, -b, -c, -d) ont été identifiées dans les souches d'*O. cf. ovata* présentes sur la côte basque.
- Des toxines issues de familles chimiques différentes sont produites par des souches méditerranéennes d'*Ostreopsis cf. ovata* - les liguriatoxine et rivieratoxine – ou par des souches coréennes – ostreol.
- *Ostreopsis siamensis* trouvées sur la côte basque et en méditerranée ne produisent pas de toxines du groupe de la PLTX.

6 Toxicité

Les toxines produites par *Ostreopsis* sont nombreuses et sont présentées dans le chapitre précédent. Les toxines identifiées à ce jour sur la côte Basque française sont des OVTX mais les données toxicologiques disponibles concernent surtout la PLTX. Pour les autres toxines produites par *Ostreopsis*, il y a très peu voire pas de données toxicologiques. Même si *Ostreopsis* cf. *ovata* et *Ostreopsis* cf. *siamensis* ne produisent pas de PLTX, la plupart des toxines produites, dont les OVTX, sont proches structurellement de la PLTX (voir chapitre toxines). C'est pour cette raison que la toxicité de la PLTX est détaillée dans ce rapport.

6.1 Toxicité de la palytoxine (PLTX)

6.1.1 Cinétique

Peu de données ont été publiées sur la cinétique associée à une exposition à la PLTX. L'absorption et la distribution systémique de la PLTX suite à une exposition respiratoire ou orale sont prouvées par les effets observés sur de nombreux organes et tissus (Tubaro *et al.*, 2011b ; Poli *et al.*, 2018 ; Boente-Juncal *et al.*, 2020 a et b). Mais le ou les mécanisme(s) de passage membranaire reste(ent) inconnu(s). Des études *in vitro* utilisant un modèle cellulaire de type monocouche entérocytaire (Caco-2) indiquent que l'absorption de la PLTX par l'intestin est faible malgré un effet sur l'intégrité de l'épithélium. En effet, la PLTX affecte l'intégrité de la monocouche à des concentrations supérieures ou égales à 1,35 nM entre 2 et 10h de traitement (Fernández *et al.*, 2013) et pour des concentrations aussi faibles que 0,25 ng.mL⁻¹ (environ 0,1 nM) après 24h d'exposition (Gémin *et al.*, 2022). Malgré l'altération de l'intégrité de l'épithélium, les mesures de perméabilité indiquent que la PLTX ajoutée du côté apical ne franchit pas la monocouche de cellules intestinales (Fernandez *et al.*, 2013), ou en tout cas pas dans des proportions quantifiables en raison des très faibles concentrations de PLTX utilisées (Gémin *et al.*, 2022).

Il n'y a pas de donnée sur l'absorption cutanée, ni sur le métabolisme ou l'excrétion de la PLTX.

6.1.2 *In vivo*

6.1.2.1 Toxicité aiguë

La toxicité de la PLTX et de certains de ses analogues a fait l'objet de plusieurs études sur animal depuis une cinquantaine d'années. Certaines rapportent des doses létales aiguës estimées chez plusieurs espèces et selon plusieurs voies d'administration, notamment respiratoire, orale, intraveineuse (iv), intrapéritonéale (ip) et intramusculaire (im) (Tableau VII). La toxicité aiguë de la PLTX vis-à-vis des mammifères est fortement dépendante de la voie d'administration. Les administrations en aérosol et par voie iv se sont avérées les plus toxiques, compte-tenu des faibles valeurs de DL₅₀ correspondantes. La toxicité de la PLTX est présentée ci-après selon les différentes voies d'administration testées sur mammifères.

Tableau VII : toxicité *in vivo* (DL50) des toxines du groupe de la PLTX .

iv : intraveineuse ; ip : intrapéritonéale ; sc : sous-cutanée ; im : intramusculaire

| Voie d'administration | Source de toxine | Espèce | DL ₅₀ (µg.kg ⁻¹ pc) | Référence |
|-------------------------------|--|---------------|---|-------------------------------------|
| respiratoire (intratrachéale) | PLTX (semi-purifiée de <i>Palythoa</i> spp.) | rat | 0,36 | Wiles <i>et al.</i> , 1974 |
| respiratoire (inhalation) | PLTX (<i>P. tuberculosa</i>) | rat | 0,041 | Poli <i>et al.</i> , 2018 |
| | 42-OH-PLTX (<i>P. toxica</i>) | | 0,045 | Poli <i>et al.</i> , 2018 |
| | PLTX/42-OH-PLTX (50:50) | | 0,063 | Poli <i>et al.</i> , 2018 |
| | Ovatoxine-a (culture <i>O. ovata</i>) | rat | 0,031 | Poli <i>et al.</i> , 2018 |
| orale ¹⁴ | PLTX (semi-purifiée de <i>Palythoa</i> spp.) | rat | >40 | Wiles <i>et al.</i> , 1974 |
| | PLTX (<i>P. caribaerum</i>) | souris | 510 | Munday <i>et al.</i> , 2008 |
| | PLTX (<i>P. tuberculosa</i> – pureté >90%) | | 767 | Sosa <i>et al.</i> , 2009 |
| | PLTX (<i>P. tuberculosa</i> – pure à 89%) | | 599,3 | Boente-Juncal <i>et al.</i> , 2020a |
| | 42-OH-PLTX (<i>P. tuberculosa</i>) | 651 | Tubaro <i>et al.</i> , 2011b | |
| iv | PLTX (semi-purifiée de <i>Palythoa</i> spp.) | rat | 0,089 | Wiles <i>et al.</i> , 1974 |
| | PLTX (semi-purifiée de <i>Palythoa</i> spp.) | souris | 0,45 | Wiles <i>et al.</i> , 1974 |
| | PLTX (purifiée de <i>Palythoa tuberculosa</i>) | souris | 0,53 | Deguchi <i>et al.</i> , 1976 |
| | PLTX (semi-purifiée de <i>Palythoa</i> spp.) | singe | 0,078 | Wiles <i>et al.</i> , 1974 |
| | PLTX (semi-purifiée de <i>Palythoa</i> spp.) | chien | 0,033 | Wiles <i>et al.</i> , 1974 |
| | PLTX (semi-purifiée de <i>Palythoa</i> spp.) | lapin | 0,025 | Wiles <i>et al.</i> , 1974 |
| | PLTX (semi-purifiée de <i>Palythoa</i> spp.) | cochon d'Inde | 0,11 | Wiles <i>et al.</i> , 1974 |
| ip | PLTX (semi-purifiée de <i>Palythoa</i> spp.) | rat | 0,63 | Wiles <i>et al.</i> , 1974 |
| | PLTX (<i>P. tuberculosa</i>) | | 1,81 | Poli <i>et al.</i> , 2018 |
| | 42-OH-PLTX (<i>P. toxica</i>) | | 1,93 | Poli <i>et al.</i> , 2018 |
| | PLTX/42-OH-PLTX (50:50) | | 0,92 | Poli <i>et al.</i> , 2018 |
| | Ovatoxine-a (culture <i>O. ovata</i>) | | 3,26 | Poli <i>et al.</i> , 2018 |
| | PLTX (<i>P. tuberculosa</i> – pure à 99%) | souris | 0,5 | Levine <i>et al.</i> , 1987 |
| | PLTX (<i>P. tuberculosa</i>) | | 0,295 | Riobó <i>et al.</i> , 2008 |
| | PLTX | | 0,72 | Rhodes <i>et al.</i> , 2002 |
| | PLTX (<i>P. tuberculosa</i> – pure à 89%) | | 0,68 | Boente-Juncal <i>et al.</i> , 2020a |
| | Ostreocine-D (<i>O. siamensis</i>) | | 0,75 | Usami <i>et al.</i> , 1995 |
| | Mascarenotoxine-A (extrait brut de <i>O. mascarenensis</i>) | | 900 | Lenoir <i>et al.</i> , 2004 |
| | Ostréotoxine (<i>O. lenticularis</i>) | | 32100 | Tindall <i>et al.</i> , 1990 |
| | PLTX (semi-purifiée de <i>Palythoa</i> spp.) | | 1,39 | Wiles <i>et al.</i> , 1974 |
| sc | PLTX (semi-purifiée de <i>Palythoa</i> spp.) | 0,4 | Wiles <i>et al.</i> , 1974 | |
| im | PLTX (semi-purifiée de <i>Palythoa</i> spp.) | 0,24 | Wiles <i>et al.</i> , 1974 | |
| intrarectale | PLTX (semi-purifiée de <i>Palythoa</i> spp.) | rat | >10 | Wiles <i>et al.</i> , 1974 |

Pour chaque toxine, les résultats des études *in vivo* avec administration par les voies aérienne, orale ou topique ainsi que par injections intra-péritonéale (communément utilisée pour évaluer

¹⁴ Par gavage.

la toxicité d'extraits de microalgues toxiques) ou intraveineuse seront particulièrement détaillés dans la suite de ce chapitre. Pour chaque voie d'exposition, les études de toxicité aiguë puis de toxicité par administrations répétées (si disponible) seront analysées.

6.1.2.2 Inhalation et instillation intratrachéale

Toxicité aiguë

L'étude de Poli *et al.* (2018) a consisté à évaluer dans un premier temps la DL₅₀ par inhalation⁹ sur des rats Fischer femelles. Des groupes de 8 animaux/dose ont été exposés lors d'une première expérience à 40, 8, et 4 µg.mL⁻¹ puis lors d'une deuxième expérience à 8, 6, 4, 2, et 0,8 µg.mL⁻¹.

Par inhalation¹⁵, la DL₅₀ de la PLTX est de 0,041 µg.kg⁻¹ pc (Poli *et al.*, 2018, Tableau XVIII, annexe 2). Dans un second temps, en suivant le même protocole, un groupe de 15 animaux exposés à une seule dose (4 µg.mL⁻¹) a servi pour suivre les lésions générées jusqu'à 36 h après traitement. Des lésions sont observées sur un grand nombre de tissus. Douze heures après l'exposition à la PLTX, tous les rats montrent des lésions histologiques au niveau pulmonaire : nécrose de l'épithélium des grandes voies respiratoires, exsudation de fibrine dans la lumière alvéolaire des zones périphériques des grandes voies respiratoires (bronches secondaires et bronchioles), augmentation des macrophages alvéolaires, inflammation à neutrophiles et œdème. Ces lésions sont modérées à sévères et affectent 50 à 75% de l'aire pulmonaire. De plus, l'épithélium nasal présente une dégénérescence et une nécrose légère à modérée avec une inflammation à neutrophiles. De manière similaire, une nécrose, une dégénérescence et/ou une perte de l'épithélium sont observées au niveau de la trachée tandis qu'au niveau du foie, une congestion marquée de la zone centro-lobulaire est rapportée sans changement histologique significatif des hépatocytes. Plusieurs tissus lymphoïdes (thymus, rate, ganglions lymphatiques mésentériques et/ou mandibulaires) sont également touchés (nécrose et/ou apoptose légère à modérée des lymphocytes et/ou déplétion).

Au niveau cardiaque, les cardiomyocytes du ventricule droit et/ou des muscles papillaires subissent une dégénérescence légère et une nécrose aiguë, avec gonflement cytoplasmique ou hyperéosinophilie et pycnose nucléaire¹⁶ (avec ou sans précipitation minérale).

De plus, chez quelques rats, des altérations de type dégénérescence/nécrose sont observées sur l'épithélium rénal tubulaire et l'épithélium du conduit de la glande salivaire mandibulaire. Vingt-quatre heures après exposition, tous les rats présentent des lésions au niveau de l'ensemble de ces tissus et organes (Tableau XVIII, annexe 2). Les lésions sont similaires à celles observées à douze heures mais avec un degré de sévérité plus élevé. Dans les poumons, l'exsudation de fibrine est plus étendue, les septa alvéolaires sont souvent nécrotiques avec une hémorragie locale, et une inflammation plus intense impliquant plus de neutrophiles dont certains en dégénérescence dans les zones à nécrose. Dans le cœur, des infiltrations d'histiocytes (macrophages du tissu conjonctif), de lymphocytes et de quelques neutrophiles sont observées dans les zones nécrotiques. Le foie présente une nécrose coagulante des hépatocytes et une congestion marquée à sévère dans la zone centro-lobulaire. De même, une dégénérescence/nécrose des tubules rénaux, du conduit de la glande salivaire submandibulaire, du thymus et de nodules lymphatiques est observée. À 36 heures,

¹⁵ Nez seulement, 15 à 20 min d'exposition, moyenne des diamètres aérodynamiques médians de masse = 1,04 ± 0,01 µm et avec au moins 99,98% des particules comptées qui avaient un diamètre de moins de 3,52 µm.

¹⁶ Rétraction

les mêmes effets sont encore observés mais avec un degré de sévérité encore plus élevé. Les données sont compilées dans le Tableau XVIII de l'annexe 2.

La DL₅₀ à 24h de la PLTX administrée par voie intratrachéale à des rats Wistar mâles est de 0,36 µg.kg⁻¹ pc (Tableau VII) (Wiles *et al.*, 1974), ce qui est environ 10 fois plus élevé que par inhalation (Poli *et al.*, 2018). Dans l'étude de Wiles *et al.* (1974), il convient de noter que la PLTX est semi-purifiée, et préparée dans un mélange 1:1 eau/éthanol¹⁷. Au cours des 10 jours d'observation suivant l'administration, des morts continuent d'être observés et les DL₅₀ respectives à 5 et 10 jours sont estimées à 0,31 µg.kg⁻¹ pc et 0,18 µg.kg⁻¹ pc (Wiles *et al.*, 1974). Les animaux présentent des difficultés respiratoires et une respiration sifflante. L'instillation intratrachéale de la PLTX chez la souris provoque une hémorragie alvéolaire, un œdème pulmonaire, une érosion gastro-intestinale et une atrophie glomérulaire (Ito et Yasumoto, 2009). La mort survient à la suite de symptômes paralytiques, pour une dose de 2 µg.kg⁻¹ pc chez la souris et de 5 à 7,5 µg.kg⁻¹ pc chez le rat (temps d'observation non indiqué). À une dose sublétales (1 µg.kg⁻¹ pc), les souris sont paralysées et ne peuvent plus se mouvoir pendant 1 à 2 h avant de se rétablir de cette paralysie. Après 24 h, ces souris présentent un aspect normal, mais l'analyse tissulaire montre de multiples lésions (emphysème pulmonaire, œdème gastro-intestinal et atrophie glomérulaire). Les signes d'intoxication sont similaires chez le rat et la souris à 1 µg.kg⁻¹ pc mais les dommages observés au niveau du poumon sont légèrement plus marqués chez les rats.

Toxicité après administrations répétées

Aucune étude de toxicité répétée de la PLTX par inhalation ou instillation nasale/intratrachéale n'est disponible.

6.1.2.3 Ingestion

Toxicité aiguë

Les premières études de toxicité de la PLTX (extrait purifié de *Palythoa*) par gavage ont été réalisées par Wiles *et al.* (1974). Peu ou pas de signes toxiques ont été observés avec des doses jusqu'à 10 µg.kg⁻¹ pc et pour des doses plus fortes de 20 et 40 µg.kg⁻¹ pc, si ce n'est la mortalité d'un des quatre rats testés. Elles montrent que la DL₅₀ à 24h serait supérieure à 40 µg.kg⁻¹ pc, et sans signe de toxicité ou de mortalité additionnel jusqu'à 72h après traitement (Wiles *et al.*, 1974).

Des études plus récentes montrent que la DL₅₀ de la PLTX à 24h chez la souris par gavage est estimée respectivement à 510 (IC₉₅ : 311-809), 599,3 (IC₉₅ : 508-707) et 767 (IC₉₅ : 549-1039) µg.kg⁻¹ pc dans trois études différentes (Munday *et al.*, 2008 ; Sosa *et al.*, 2009 ; Boente-Juncal *et al.*, 2020a – Tableau VII). Ces valeurs sont largement supérieures aux DL₅₀ publiées par les voies iv et ip. Les auteurs proposent deux explications concernant cette moindre toxicité par voie orale. La première serait que la PLTX est une grosse molécule hydrophile dont l'absorption pourrait être limitée au niveau du tractus gastro-intestinal alors que la seconde serait que la toxine pourrait être en partie dégradée par l'acidité dans l'estomac. Cependant,

¹⁷L'exposition intratrachéale a été réalisée sur 21 rats anesthésiés avec des volumes de 0,04 à 0,015 mL d'une solution-mère de 46,5 à 320 µg.mL⁻¹.

aucune donnée expérimentale ne permet de confirmer ces hypothèses. La toxicité de la PLTX pour les souris serait encore plus faible lors d'une exposition par ingestion en mélange à de la nourriture puisqu'aucun effet n'est observé à une dose de 2500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc (Munday, 2006). Il n'y a pas, dans l'étude de Sosa *et al.* (2009), de relation entre la dose administrée et la durée de survie. Depuis ces travaux plusieurs expérimentations ont été menées chez des souris afin de caractériser la toxicité aiguë de la PLTX et chez l'Homme exposé par voie alimentaire, dont trois études clefs présentées ci-après.

- Etude de Sosa *et al.*, 2009¹⁸

Les symptômes les plus fréquents observés sur les animaux étant morts pendant la période d'observation sont : des spasmes (86%), une paralysie impliquant principalement les membres postérieurs (80%), une détresse respiratoire (70%), un grattage (57%), et des sauts (50%). Le grattage récurrent est observé à toutes les doses (300-1697 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc). Ces symptômes sont comparables à ceux qui sont observés après exposition par voie ip. Ces symptômes révèlent le caractère neurotoxique de la PLTX, au niveau des muscles squelettiques, incluant ceux de la cage respiratoire, et du système nerveux sensoriel.

L'étude a également porté sur l'observation histologique de très nombreux organes ainsi que sur des analyses sanguines. Ainsi, des altérations histologiques sur différents organes (estomac, foie, pancréas, rein) ont été observées, à la fois sur les souris étant mortes lors de la période de 24 h d'observation et sur les souris ayant survécu. L'analyse histologique des souris mortes montre quasi systématiquement des effets au niveau du foie et du pancréas. Ainsi, une forte diminution voire une absence de glycogène hépatique est observée. La réduction de glycogène hépatique est également observée chez les souris ayant survécu ainsi qu'une diminution des sécrétions enzymatiques des acini glandulaires pancréatiques. Chez ces souris survivantes, les effets majeurs sont observés sur l'estomac non-glandulaire avec une inflammation aiguë (minimale à modérée) des muqueuses et sous-muqueuses à partir d'une dose de 424 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc. Chez la plupart des souris mortes pendant la période d'observation et ayant reçu une dose supérieure ou égale à 600 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc, des zones rouges sont présentes dans la muqueuse de l'estomac non-glandulaire. Aucune autre altération sur les autres organes observés n'est détectée sur toutes les souris.

Il n'est pas observé d'effet sur le poids des animaux ni sur la formule leucocytaire, quelle que soit la dose de PLTX testée. En revanche, à 600 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc et au-delà, une augmentation de CPK et de LDH¹⁹ plasmatiques est observée, ainsi que pour l'AST à partir de 848 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc et pour l'ALT²⁰ seulement à 848 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc. Il n'y a pas d'effet sur le niveau de créatinine.

Les auteurs ne notent pas de modifications macroscopiques des muscles cardiaques et squelettiques chez les souris ayant reçu une dose orale de PLTX jusqu'à 1697 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc. En revanche, des modifications ultra-structurales, comme l'agrégation des mitochondries et la dégénérescence des fibres sont observées de manière dose dépendante, en microscopie électronique. Aucun impact sur la mortalité ni sur les niveaux en fréquence et en sévérité des altérations histologiques n'a été relevé lorsque la période de jeûne avant gavage passe de 16h à 3 h, pour des doses de 848 et 1200 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc.

¹⁸PLTX isolée de *Palythoa* (Wako, pureté >90%). Doses de PLTX testées : 0, 300, 424, 600, 848, 1200 et 1697 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc, dissoute dans du PBS, sur des groupes de 5 souris CD-1 femelles (achetées à 18-20 g, âgées de 4 semaines) jeûne de 16h.

¹⁹ CPK : Créatine phosphokinase – LDH : Lactate déshydrogénase.

²⁰ AST : Aspartate-aminotransférase et ALT : Alanine-aminotransférase.

D'après les symptômes observés, les muscles squelettiques et cardiaque sont ciblés par la toxine, même si ces tissus ne subissent que peu ou pas de modification structurale. Les auteurs proposent un NOAEL de 300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ pc pour la PLTX après administration orale aiguë chez la souris.

- Etude d'Ito et Yasumoto, 2009²¹

Ce travail a également testé l'administration de PLTX par gavage sur souris. La dose de 200 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ pc n'est pas létale. L'analyse des souris après sacrifice révèle, à cette dose, des lésions légères de l'estomac, de l'intestin grêle, des poumons et des reins. Les auteurs notent également une légère accumulation de jus gastrique dans l'estomac. Ces effets, qualifiés d'inflammatoires, sont apparus assez rapidement (en deux heures). Les auteurs proposent, sur la base de ces observations, un LOAEL de 200 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ pc pour la PLTX.

Les auteurs ont également étudié l'influence de l'alimentation dans l'absorption de la PLTX. Ils ont ajouté à la PLTX des composants alimentaires favorisant l'absorption des lipides : huile de trioléine, lécithine, lysolécithine ou acide désoxycholique d'une part et d'autre part des extraits aqueux de crabes (*Ovalipes punctatus*) ou de maquereaux (*Scomber australasicus*) qui sont des vecteurs alimentaires classiques de PLTX pour les humains. Il n'est alors constaté aucun symptôme, ni de létalité dans les 24 heures. Enfin, la toxicité de la PLTX (200 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ pc) n'est pas modifiée si elle est administrée à des souris présentant un ulcère gastrique. Ces données suggèrent que ni les composants alimentaires testés ni la présence préalable d'un ulcère gastrique ne modifient la toxicité et l'absorption intestinale de la PLTX.

La PLTX a été administrée à des souris par voie sublinguale à une dose d'environ 200 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ pc (entre 176 et 235 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ pc). L'objectif de cette exposition est de mimer une intoxication alimentaire au cours de laquelle la toxine entrerait en contact avec les tissus de la bouche et de l'œsophage, avant d'atteindre le reste du tractus digestif. La toxine est déposée en 3 à 4 fois à 5 min d'intervalle dans un volume très faible (2 μL) pour éviter qu'elle ne soit avalée. Les souris deviennent « inactives » pendant les quelques heures suivant le traitement et présentent une hyperventilation. L'examen après sacrifice des organes révèle un léger saignement au niveau du poumon, apparu après 30 minutes, suivi d'une inflammation interstitielle après 1,5-8 heures, puis la destruction des alvéoles pulmonaires en 8-24 h. Les tissus gastro-intestinaux ont un aspect jaunâtre, fragile et gonflé à 30 min. Les villosités de l'intestin grêle sont abîmées au niveau apical, et sécrètent un épais mucus. Au niveau des reins, les auteurs observent une atrophie glomérulaire après 8-24 h. La PLTX, administrée directement dans la cavité buccale, a donc atteint la circulation et les organes susmentionnés pour induire des perturbations structurales et fonctionnelles bien plus sévères qu'en cas d'administration par gavage.

²¹ PLTX d'origine commerciale (Wako, sans mention de la pureté). Doses de PLTX administrées par gavage dans une solution saline : 200 et 500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ pc, sur des souris mâles ICR (achetées âgées de 3-4 semaines) sans jeûne alimentaire (n=2). Un lot témoin a été réalisé (n=6). La PLTX (200 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ pc) a été testée sur des lots de 2 souris avec des composants alimentaires (huile de trioléine, lécithine, lysolécithine ou acide désoxycholique) ; diluée dans 0,3 mL d'extraits de crabe (*Ovalipes punctatus*) ou de maquereaux (*Scomber australasicus*) (n=5). Elle a également été testée (200 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ pc, n=6) sur des souris avec une ulcération gastro-intestinale (0,3 M HCl dans 60% éthanol pendant 1h).

- Etude de Boente-Juncal *et al.*, 2020a²²

L'étude de létalité a permis de déterminer une DL₅₀ de 599,3 µg.kg⁻¹ pc (IC₉₅ : 508-707, Tableau VI), proche des valeurs des deux autres études. À la dose de 1200 µg.kg⁻¹ pc, les souris meurent dans les deux heures après administration de la toxine par gavage, et présentent des signes de détresse respiratoire et de douleur (ataxie, léthargie, cyphose, cyanose, dyspnée, pilo-érection) et de douleur abdominale. Ces signes diminuent à mesure que les doses sont réduites. À la dose de 750 µg.kg⁻¹ pc, une souris ayant survécu pendant 9 h a présenté une hémorragie intense dans la cavité abdominale.

Cette étude propose un NOAEL de 15 µg.kg⁻¹ pc. Les souris exposées à 15 µg.kg⁻¹ pc de PLTX n'ont montré aucun signe de douleur ni d'autres symptômes et sont restées en bonne santé pendant la totalité de la période d'observation (96 h). Contrairement à l'étude de Sosa *et al.* (2009), les souris n'ont pas de symptôme de démangeaison (grattage), ni de saut. L'une des différences entre les deux études, outre la souche génétique des souris utilisées, est un accès libre à la nourriture et à l'eau pendant le traitement dans l'étude de Boente-Juncal *et al.* (2020a), alors que les animaux ont été privés de nourriture 16h avant et 2 h après le traitement dans l'étude de Sosa *et al.* (2009).

Des analyses biochimiques sanguines ont également été réalisées. La PLTX ne modifie pas la glycémie ni la cholestérolémie. Cependant, les concentrations plasmatiques d'ALT, d'AST, de CPK et de LDH ont augmenté de manière significative après une administration de PLTX à des doses de 36 µg.kg⁻¹ pc et plus. Les faibles doses de PLTX ne provoquent pas de changements significatifs de la natrémie et de la chlorémie ; seule une augmentation significative a été observée à la dose de 300 µg.kg⁻¹ pc (pour Na⁺ et Cl⁻), alors qu'à 1200 µg.kg⁻¹ pc, une diminution de la natrémie est observée. Pour des fortes doses allant de 750 et 1200 µg.kg⁻¹ pc, il a été observé une augmentation de la kaliémie.

L'analyse ultra-structurale du foie et des reins a été réalisée sur des souris témoins et traitées avec 500 et 750 µg.kg⁻¹ pc de PLTX. Des lésions hépatiques sont visibles après 96 h. Au niveau des organites intracellulaires, à 500 µg.kg⁻¹ pc de PLTX, quelques noyaux d'hépatocytes sont abîmés, mais les mitochondries et le réticulum endoplasmique sont normaux. À 750 µg.kg⁻¹ pc de PLTX, une diminution de la concentration en glycogène hépatique est également observée, ainsi qu'une désorganisation des mitochondries et un détachement des ribosomes du réticulum endoplasmique, avec dégranulation. À cette dose, plusieurs autophagosomes contenant des débris cellulaires sont présents dans les hépatocytes. Les effets de la PLTX se manifestent également au niveau du rein. À 750 µg.kg⁻¹ pc, mais pas à 500 µg.kg⁻¹ pc, la PLTX provoque des altérations de la structure du néphron : les noyaux des podocytes sont irréguliers, les podocytes individuels sont fusionnés. Ces effets sur les reins peuvent être comparés aux effets observables chez l'Homme après intoxication par des poissons contaminés par la PLTX (PLTX identifiée dans des harengs (*Herklotsichthys quadrimaculatus*) par LCMS) (Wu *et al.*, 2014).

²² PLTX extraite de *Palythoa tuberculosa* (Wako, pure à 88,9%). Doses de PLTX administrées par gavage dans une solution saline : 15, 36, 100, 350, 500, 750, 1200 µg.kg⁻¹ pc, sur des souris femelles Swiss (18-21 g, âgées de 4 semaines au début de l'expérience). Chaque dose de PLTX est testée sur n = 3 à 9 souris. Les résultats du groupe témoin ne sont pas mentionnés dans les tableaux pour la mortalité et les symptômes, mais indiqués dans les figures sur les résultats sanguins (n=7). Pas de jeune alimentaire.

Toxicité après administrations répétées

L'exposition humaine à la PLTX est susceptible de se produire par la consommation de denrées alimentaires contaminées, notamment pour des populations vivant dans des zones littorales. Une exposition répétée pendant une période limitée est alors probable. Différentes études expérimentales ont évalué la toxicité de la PLTX par voie orale après des administrations répétées.

- Etude de Del Favero *et al.*, 2013²³

Dans une première expérimentation, trois doses de PLTX ont été administrées par gavage, qualifiées de faible (30 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc), intermédiaire (90 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc) et forte (180 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc). Trois groupes de six souris femelles CD1 ont ainsi été gavés pendant 7 jours consécutifs, suivis d'une phase sans traitement de 2 semaines. Vingt-quatre heures après le dernier traitement, trois souris de chaque groupe ont été sacrifiées tandis que les souris restantes ont été maintenues sans traitement pendant 2 semaines. À la fin des 7 jours de gavage, le pourcentage de mortalité a augmenté avec la dose de PLTX ingérée : 2/6 pour 30 et 90 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc et 5/6 pour 180 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc. Au cours de la phase de récupération, une souris traitée avec la plus faible dose et deux traitées avec la dose intermédiaire sont mortes. La souris restante traitée à la plus forte dose est restée vivante jusqu'à la fin de l'expérimentation. Par ailleurs, le poids des souris diminue pour tous les groupes jusqu'à -40% alors que leur consommation de nourriture diminue dès le deuxième jour. Juste avant la mort, les souris montrent les symptômes suivants : une perte de coordination motrice, une hypo-réactivité, une sédation générale avec une perte de réflexes et, dans certains cas, une paralysie des membres inférieurs. La mort est précédée par des difficultés respiratoires et des halètements.

Indépendamment des effets létaux, l'abdomen est gonflé dès le troisième jour de traitement, ce symptôme affectant plus de souris avec la faible dose (4/6) qu'avec la dose intermédiaire (3/6) et la dose forte (1/6). Chez les souris avec un abdomen gonflé, une accumulation de liquide et de gaz dans le tractus intestinal est observée, avec une masse de fèces moins importante que chez les souris témoins. La présence de chromodiacryorrhée (écoulement de larmes rouges en raison de la présence de porphyrine²⁴) est également visible pour quelques souris à 30 et 90 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc dès le 3^{ème}/4^{ème} jour. À la différence du foie, des poumons et du cerveau, une augmentation du poids relatif des reins, de la rate et du cœur est observée uniquement à la plus forte dose (180 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc).

Au niveau pulmonaire, des altérations histologiques (œdème alvéolaire faible à sévère, associé parfois à une inflammation aiguë et à de la nécrose) sont observées pour toutes les doses, principalement chez les souris mortes avant la fin du traitement et probablement associées aux difficultés respiratoires observées chez ces animaux. Des altérations du muscle cardiaque (séparation des fibres musculaires pour les doses de 90 et 180 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc) et, dans une moindre mesure à 30 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc sont également notées. Au niveau hépatique, une diminution de la concentration en glycogène est observée notamment chez les souris mortes pendant le traitement. Des plages de nécrose sont également visibles chez une souris morte (dose élevée). Il y a peu d'effets au niveau de l'estomac alors qu'au niveau de la rate, si aucun

²³ PLTX extraite de *P. tuberculosa* (Wako, pure à plus de 90%). Doses de PLTX administrées par gavage dans du PBS: 30, 90 et 180 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc par jour pendant 7 jours, sur des groupes de 6 souris CD-1 femelles (achetées à 18-20 g, âgées de 4 semaines), ou un groupe témoin avec véhicule. Autres doses testées : 3 et 30 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc par jour pendant 7 jours, sur des groupes de 8 souris, ou un groupe témoin avec véhicule. Pas de jeûne alimentaire.

²⁴ Composant de l'hémoglobine.

effet n'est relevé à $180 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ pc}$, les souris mortes pendant le traitement à 30 et $90 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ pc}$ montrent une déplétion modérée des éléments lymphoïdes des follicules lymphatiques.

Dans la seconde expérience, réalisée pour déterminer un NOAEL, des groupes de huit animaux sont exposés par gavage à 3 et $30 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ pc.j}^{-1}$ de PLTX pendant 7 jours consécutifs. Cinq souris par groupe sont euthanasiées 24 heures après le dernier gavage. Les animaux restants sont gardés pendant deux autres semaines pour évaluer la réversibilité des dommages. Aucune mortalité n'a été observée au cours de cette seconde étude. Aucune altération ni signe clinique ne sont observés pour le groupe traité à $3 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ pc}$ alors que les souris traitées avec $30 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ pc}$ montrent de légers signes d'hypoactivité transitoires et des épisodes de grattage sporadiques. De plus, deux souris présentent un gonflement de l'abdomen. Aucun changement de poids n'est observé avec le groupe exposé à $3 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ pc}$, alors qu'une diminution de 25% associée à une diminution de la consommation de nourriture est observée pour le groupe exposé à $30 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ pc}$. Pendant la période de récupération, la consommation de nourriture et les poids des animaux reviennent à la normale. Aucune variation significative des poids relatifs des différents organes (foie, rein, poumons, rate, cerveau et cœur) n'est observée. Au niveau plasmatique, pour les deux groupes, il n'y a pas de variation significative des transaminases, de la CPK, de la LDH, ainsi que de la natrémie, la kaliémie, la calcémie, la chlorémie et la phosphatémie (phosphate inorganique). Aucune variation statistiquement significative à 3 et $30 \mu\text{g/kg}$ pour AST, ALT, LDH, CPL, natrémie, vcalcémie, chloremie, phosphatémie. À la fin de la période de récupération, les niveaux sont revenus à la normale sauf pour AST et ALT qui restent plus élevés, même si les différences ne sont pas statistiquement significatives, pour le groupe traité à $30 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ pc}$.

L'analyse histologique *post-mortem* ne montre pas d'altération au niveau des poumons ni du cœur. Comme avec les plus fortes doses, mais à un degré moindre, des altérations au niveau du foie sont observées pour le groupe traité à $30 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ pc}$. Aucune altération n'est détectée au niveau de la rate.

Cette étude montre donc que l'administration orale quotidienne de PLTX pendant sept jours, peut être létale chez la souris à partir de $30 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ pc/jour}$, une dose 17 fois inférieure à la DL_{50} (Tableau VII). La mortalité peut apparaître après l'arrêt du traitement, indiquant que certains dommages ne sont pas réversibles et peuvent causer une mort différée. Les auteurs proposent un NOAEL de $3 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ pc.j}^{-1}$ et un LOAEL de $30 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ pc.j}^{-1}$. À ce LOAEL, les viscères (poumons, cœur, foie, tractus gastro-intestinal) sont des cibles importantes de la PLTX.

- Etude de Boente-Juncal *et al.*, 2020b²⁵

Dans cette étude, la toxicité par administrations répétées de la PLTX a été évaluée.

Des groupes de trois à dix souris Swiss femelles ont été traités avec la PLTX par gavage à des doses de $0,03$, $0,1$, $0,3$, 1 , $3,5$, et $10 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ pc/j}$ pendant 28 jours. Une DL_{50} de $0,44 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ pc}$ a été calculée. À $10 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ pc.j}^{-1}$, aucune souris ne survit après 18 jours de traitement, alors que 75 et 43% de mortalité sont constatés, à $3,5$ et $0,3 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ pc.j}^{-1}$ respectivement. Les premières mortalités n'apparaissent que tardivement (à partir de 17 jours de traitement pour

²⁵ PLTX extraite de *P. tuberculosis* (Wako, pure à 88,9%). Doses de PLTX administrées par gavage dans une solution saline : $0,03$, $0,1$, $0,3$, 1 , $3,5$ et $10 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ pc/j}$ pendant 28 jours, sur des souris femelles Swiss (21-25 g, âgées de 4 semaines au début de l'expérience). Chaque dose de PLTX est testée sur $n = 3$ à 10 souris. Un groupe témoin est composé de 6 souris). Pas de jeûne alimentaire.

la dose 0,3 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc). À 0,03 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc.j⁻¹, aucune mortalité n'est observée. Les temps de survie diffèrent considérablement d'un animal à un autre et pour chaque dose de toxine.

À la dose de 0,03 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc.j⁻¹ aucun symptôme typique d'une intoxication à la PLTX n'est rapporté. À la dose de 0,1 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc.j⁻¹, des symptômes typiques (léthargie, pilo-érection, douleurs abdominales, gonflement de la face, cyphose) sont observés. Les souris exposées à 1 et 3,5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc.j⁻¹ perdent du poids. L'apparition des symptômes est dose-dépendante. Certains symptômes n'apparaissent qu'à des doses plus élevées, comme l'ataxie, la dyspnée et les mouvements circulaires (à partir de 1 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc.j⁻¹), ou bien des petits cris (à partir de 3,5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc.j⁻¹).

Aucune altération macroscopique n'est relevée à la dose de 0,03 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc.j⁻¹. En revanche, un gonflement de l'abdomen, l'absence de contenu solide, la présence de gaz et d'un liquide muqueux jaune foncé au niveau de l'estomac et des intestins sont fréquemment observés chez certains animaux traités avec les doses supérieures. Au dernier jour de traitement, la quantité cumulée d'urine est moindre pour les souris traitées aux doses de 1 et 3,5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc.j⁻¹. Aucun effet sur la masse cumulée de fèces n'est observé.

L'exposition répétée entraîne des effets significatifs sur les paramètres biochimiques du sang et les paramètres urinaires. Après 28 jours ou juste après la mort de l'animal, les paramètres plasmatiques suivants ont été mesurés : natrémie, kaliémie, chlorémie, ALT, AST, LDH et CK. Les quatre enzymes ont des niveaux qui augmentent pour des doses de 0,1 et 0,3 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc.j⁻¹ de même que pour AST et ALT à 1 et 3,5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc.j⁻¹. Des variations significatives de la natrémie (diminution à la dose de 0,3 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc.j⁻¹) et de la kaliémie (augmentation aux doses de 0,03, 0,1 et 0,3 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc.j⁻¹) et consécutivement du rapport Na^+/K^+ sont observés. La chlorémie est également affectée (augmentation pour les doses de 0,03 à 1 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc.j⁻¹). Ces perturbations des concentrations ioniques plasmatiques sont en accord avec les altérations précédemment rapportées produites par une dose orale unique de PLTX. Parmi les différents paramètres urinaires mesurés (couleur, clarté, gravité spécifique, protéines, glucose, cétones, sang/hémoglobine, bilirubine et urobilinogène), seule une augmentation du taux de bilirubine a été observée à 0,1 et 3 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc.j⁻¹.

De plus, des altérations macroscopiques au niveau du tractus digestif et des altérations ultrastructurales de l'estomac sont observées. Chez les souris traitées à la dose de 1 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc.j⁻¹ pendant 9 jours ou de 3,5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc.j⁻¹ pendant 22 jours, la surface des cellules muqueuses de l'estomac est altérée et leur noyau présente un aspect irrégulier et le cytoplasme contient de nombreux autophagosomes. Aux doses de 1 et 3,5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc.j⁻¹, des altérations des cellules pariétales de l'épithélium gastrique sont visibles : dilatation du système canaliculaire, mitochondries « denses » et présence anormale d'autophagosomes, altération de la membrane nucléaire avec présence de corps apoptotiques. Ces altérations révèlent l'apoptose des cellules pariétales.

Un rétrécissement de la membrane nucléaire est également constaté, avec la présence de débris de cette membrane. Ces altérations révèlent l'apoptose des cellules pariétales.

Les données de cet article montrent que, pendant la période d'exposition de 28 jours, les souris ayant reçu une dose quotidienne de 0,03 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc.j⁻¹ de PLTX n'ont pas présenté de modifications notables. Le seul effet significatif est une hyperkaliémie (2 souris sur 5). En conclusion, ces résultats permettent de proposer un NOAEL de 0,03 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc.j⁻¹.

Lorsque la PLTX est administrée par voie sublinguale à plusieurs reprises (165 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc.j⁻¹ pendant deux ou trois jours), les souris se grattent légèrement, puis développent progressivement une cyanose, et s'affaiblissent (Ito et Yasumoto, 2009). Les auteurs

proposent qu'elles puissent être victimes d'une insuffisance cardiaque. À l'examen histologique, les poumons présentent des lésions, comparables à celles qui sont observées en exposition unique. Les lésions liées à l'œdème du tractus gastro-intestinal sont plus importantes qu'avec une seule dose. Dans l'estomac, les cellules épithéliales qui bordent la lumière et les glandes sont exfoliées, le tissu conjonctif est abrasé.

6.1.2.4 Toxicité par voie topique (dermique)

Des signes dermatologiques, notamment des dermatites, ont été associés à l'exposition cutanée probable à la PLTX ou des toxines du groupe de la PLTX pendant des proliférations d'*Ostreopsis* (Pelin *et al.*, 2011), ce qui nécessite de disposer de données expérimentales pour caractériser les effets de la PLTX sur la peau.

Toxicité aiguë

L'une des rares études expérimentales de la toxicité dermique de la PLTX est assez ancienne (Wiles *et al.*, 1974²⁶). Deux voies d'exposition, intradermique et percutanée, y ont été explorées.

- Injection intradermique

Dans les 15 à 30 minutes suivant l'injection intradermique de PLTX (sur rats, cochons d'Inde, ou lapins), un blanchiment de la peau apparaît au point d'injection, indiquant une vasoconstriction aiguë des capillaires sanguins. Après 1 à 2 heures, un œdème et un érythème sont observés autour de la zone initiale blanchie. Les auteurs ne relèvent aucun signe de toxicité, ni de létalité, dus à des effets systémiques de la PLTX.

Les examens macroscopique et microscopique *post-mortem* des animaux révèlent une nécrose focale au site d'injection de la PLTX, avec une inflammation locale. Il est aussi constaté une nécrose rénale et des altérations des vaisseaux pulmonaires. Ces données indiquent qu'une partie de la PLTX est distribuée de manière systémique et a affecté l'intégrité de certains viscères (poumons, rein).

- Application topique

Dans la même étude (Wiles *et al.*, 1974), l'application de 0,5 et 0,25 µg de PLTX sur la peau d'un lapin induit au bout de 1 à 2 heures l'apparition d'une zone blanchie et légèrement boursoufflée au site d'application. Après 4 à 5 heures, on constate un œdème et une nécrose de la zone blanchie et de la zone périphérique inflammée. Ce résultat, issu d'applications sur un seul animal, suggère que la PLTX agit en induisant des effets nécrosants et inflammatoires au niveau de la peau. Une étude plus récente a testé différentes doses de PLTX en application topique sur des oreilles de souris (Fujiki *et al.*, 1986)²⁷. L'effet irritant de la PLTX, mesuré comme étant la quantité de toxine induisant un érythème des oreilles chez 50 % des souris testées 24 heures après le test, est de 0,02 µg/oreille. Les souris meurent en 4h après l'application sur l'oreille de 33 ou 165 µg de PLTX.

²⁶ Pas de mention de l'origine de la PLTX, ni de sa pureté. La toxine a été préparée dans un mélange d'éthanol/eau. Doses de PLTX testées par voie intradermique : 1 et 10 µg. mL⁻¹ soit une quantité de 0,11 et 0,55 µg de toxine injectée par voie intradermique chez le lapin, le rat et le cochon d'Inde. Pour la voie percutanée, la PLTX en solution aqueuse (5 µg. mL⁻¹) a été appliquée le dos d'un lapin. Des volumes totaux de 0,1 ml et 0,05 mL ont été appliqués sur deux zones distinctes afin d'évaluer les effets toxiques ou irritants de la PLTX.

²⁷ PLTX extraite de *P. tuberculosa* sans mention de pureté. Les quantités de PLTX utilisées sont 0,3, 3,3, 8,25, 33 et 165 µg.

Toxicité après administrations répétées

L'administration répétée de PLTX sur la peau de souris (0,5 µg, 2 fois par semaine pendant 30 semaines), est toxique : huit souris sur quinze survivent à la semaine 30. Aucune tumeur cutanée n'est observée par les auteurs chez ces souris survivantes. En revanche, si le même schéma d'application est réalisé après une étape d'initiation avec 100 µg de diméthylbenzoanthracène (DMBA), 62,5% des souris présentent des tumeurs (avec une moyenne d'1 tumeur par souris). Les tumeurs générées sont identifiées histologiquement comme sept papillomes et un carcinome précoce invasif de cellules squameuses. La dose totale de PLTX nécessaire pour une incidence de 50% de tumeurs est estimée à 15 µg (Fujiki *et al.*, 1986).

6.1.2.5 Oculaire

Même si aucun signe systémique d'intoxication n'est observé après l'instillation oculaire chez des lapins de 0,1, 0,2 et 0,4 µg.kg⁻¹ pc de PLTX sans rinçage, plusieurs effets au niveau oculaire sont détectés (Wiles *et al.*, 1974) :

- en 4 h, on constate l'apparition d'un larmoiement modéré, d'irritation, de gonflement, d'œdème et de conjonctivite ;
- à 24 h, les yeux affectés sont complètement fermés avec un exsudat de pus et de sang ainsi qu'une conjonctivite sévère, avec œdème, ulcération cornéenne et opacité.

Ces signes persistent à différents degrés pendant sept jours. Les effets toxiques apparaissent plus tôt si la concentration de PLTX est plus élevée mais, après 24 h, les effets sont similaires quelle que soit la concentration utilisée. Les plus fortes concentrations de PLTX provoquent des séquelles irréversibles. Avec les doses plus faibles, la récupération est plus rapide et complète. Ainsi, les lésions oculaires observées à 0,4 µg.kg⁻¹ pc sont irréversibles avec la présence d'une cornée ulcérée, d'adhésions entre l'iris et la cornée (synéchie antérieure) et un glaucome secondaire.

Lorsqu'une application de 5 µg.kg⁻¹ pc de PLTX suivie d'un rinçage avec une solution isotonique saline à 1, 5 ou 15 min, tous les animaux montrent des dommages conjonctifs et cornéens modérés à sévères en 24 h. Les effets irritants apparaissent autour de 2 h pour tous les animaux, indépendamment du temps d'exposition à la PLTX. En revanche, un certain degré de récupération est observé en 48 h chez quelques animaux : les yeux sont ouverts et la quantité de pus diminue, mais pour un rinçage à 5 et 15 min, un œdème faible à modéré persiste, ainsi que des signes d'irritation et une opacité cornéenne (Wiles *et al.*, 1974).

6.1.2.6 Injection intrapéritonéale

Toxicité aiguë

Les valeurs de DL₅₀ de la PLTX par injection i.p. sur rongeurs sont comparables à celles obtenues après des injections i.m. et s.c. (Tableau VII). La DL₅₀ à 24 h sur des rats est de 0,63 µg.kg⁻¹ pc (Tableau VII). Elle est très proche de celle déterminée sur des souris (0,72 µg.kg⁻¹ pc) (Rhodes *et al.*, 2002). Les signes toxiques et la rapidité de leur apparition sont similaires à ceux observés pour les voies intramusculaire et sous-cutanée (Wiles *et al.*, 1974). Plus récemment, la DL₅₀ a été estimée à 1,81 µg.kg⁻¹ pc sur des rats Fischer femelles (Poli *et al.*,

2018). La toxicité est cependant significativement inférieure à celle observée par voie i.v. ou par inhalation. À des doses létales (4 à 5 fois la DL₅₀), la mort survient après environ 1 h (Riobó *et al.*, 2008). À des doses légèrement supérieures à la DL₅₀, les animaux meurent après 3 à 5 heures (Ito *et al.*, 1996). À des doses proches de la DL₅₀, les souris meurent après 12 à 40 heures (Riobó *et al.*, 2008 ; Munday *et al.*, 2011).

Les signes observés après exposition à une dose létale de PLTX par voie i.p. sont l'ataxie et une piloérection, qui surviennent assez rapidement, un étirement des membres postérieurs, des spasmes musculaires, une dyspnée et une détresse respiratoire, une paralysie musculaire progressive (Ito *et al.*, 1996, Rhodes *et al.*, 2002, Riobó *et al.*, 2008). Après 30 à 60 minutes, en fonction de la dose, les membres postérieurs des animaux sont allongés et paralysés. La fréquence respiratoire diminue, avec des halètements occasionnels, et la paralysie s'étend à l'ensemble du corps. Les souris ne répondent alors plus aux stimulations tactiles. Une détresse respiratoire, qui s'accompagne d'une exophtalmie et d'une cyanose, précède la mort (Moore et Scheuer, 1971 ; Rhodes *et al.*, 2002 ; Riobó *et al.*, 2008 ; Sosa *et al.*, 2009).

L'examen histologique *post-mortem* montre des adhérences au niveau du péritoine, avec ascite²⁸ et dilatation de l'intestin grêle, qui présente des nécroses unicellulaires, des saignements et des œdèmes (Ito *et al.*, 1996). Ce même effet de nécrose cellulaire individuelle est également observé dans le cœur et au niveau des lymphocytes du thymus et de la rate (Terao *et al.*, 1992). En microscopie électronique, on observe un gonflement des mitochondries et une séparation des organites intracellulaires dans les myocytes, ainsi qu'une déplétion des microvillosités dans les tubules rénaux et une vacuolisation des cellules acineuses pancréatiques (Ito *et al.*, 1996, 2009 ; Terao *et al.*, 1992 ; Poli *et al.*, 2018). Après trois heures, tous les organes montrent une congestion marquée. Histologiquement, le cœur est l'organe le plus touché avec de nombreuses nécroses de cellules individuelles au niveau du myocarde, des deux ventricules et du septum. Des cellules du myocarde apparaissent gonflées, en dessous de myocytes nécrosés.

Au niveau ultra-structural, les mitochondries sont arrondies, la matrice mitochondriale est plus dense mais l'organisation des crêtes reste normale et la plupart des organites (dont les myofibrilles et le réticulum sarcoplasmique) sont séparés les uns des autres (Terao *et al.*, 1992 ; Ito *et al.*, 1996). Les cellules endothéliales des capillaires de l'interstitium sont également gonflées. Ces modifications sont observées jusqu'à 24 h. Des altérations au niveau rénal sont également observées avec beaucoup de vacuoles autophagiques et de lysosomes en dessous de la bordure en brosse des tubes contournés proximaux et, parfois, une destruction des microvillosités. De nombreuses gouttelettes lipidiques et l'accumulation de matériel dense dans le réticulum endoplasmique lisse sont souvent observées. Les tubes contournés distaux sont également altérés avec perte de microvillosités et gonflement cytoplasmique. En revanche, il n'y a pas de changement observé au niveau des glomérules (Poli *et al.*, 2018).

Au niveau hépatique, les hépatocytes de la zone centrale présentent des vacuoles aqueuses et une accumulation de gouttelettes lipidiques. Dans les acini pancréatiques, de nombreuses vacuoles autophagiques sont observées dans la région du réticulum endoplasmique rugueux. Au niveau du petit intestin, des vacuoles dans les cellules absorbantes intestinales sont formées (Poli *et al.*, 2018).

La PLTX (1 µg.kg⁻¹ pc) administrée à des souris induit des lésions intestinales : en moins d'une heure, les villosités de l'intestin grêle sont hémorragiques. Après 6 h, la congestion des

²⁸ Accumulation de liquide dans l'abdomen

villosités et l'œdème de la *lamina propria* sont significativement développés. Après 16 h, les animaux sont atteints de diarrhée, qui s'accompagne d'une péritonite aiguë. Après 24 h, les villosités perdent leurs cellules épithéliales, et se rabougrissent. L'hypersécrétion de mucus du gros intestin est très probablement stimulée physiquement par la péritonite, qui favorise la diarrhée (Ito *et al.*, 1996). Sur le plan biochimique, des taux plasmatiques élevés de CK sont observés chez des souris après exposition i.p. à une dose sub létale de PLTX extraite d'*Ostreopsis* sp ou de la chair de poisson-perroquet *Scarus ovifrons*²⁹ (Taniyama *et al.*, 2003). Ainsi, la PLTX par voie i.p. induit des altérations sévères au niveau du cœur, du rein, du foie, du pancréas et de l'intestin grêle. L'hyperkaliémie provoque probablement des effets directs de la PLTX sur diverses cellules comme les érythrocytes et les cellules endothéliales du système vasculaire. Les effets cardiaques semblent dus à l'hyperkaliémie alors que les effets rénaux seraient plutôt associés à un effet direct sur la Na⁺/K⁺ ATPase (Terao *et al.*, 1992).

Des rats femelles Fischer de cinq à sept semaines ont reçu une injection i.p. de PLTX (pureté ~90–95%, Wako) à 0,25, 0,5, 1, 2,5, et 5 µg.kg⁻¹ pc (Poli *et al.*, 2018). Aucun rat euthanasié immédiatement après le traitement n'a montré de lésions histologiques, ce qui n'est pas étonnant puisqu'un laps de temps de 24 heures ou plus après la blessure ou la mort du tissu est généralement nécessaire pour que les changements microscopiques deviennent visibles en histologie. En revanche, sur certains rats morts vers la fin de l'étude et/ou ayant survécu, des altérations histologiques ont été relevées au niveau :

- de la cavité nasale : dégénérescence et nécrose de l'épithélium ;
- pulmonaire : présence de fibrine dans la lumière alvéolaire ainsi que hémorragies et œdèmes ;
- hépatique : zones de nécrose et dégénérescence vacuolaire des hépatocytes ;
- rénal : dégénérescence minimale à modérée de l'épithélium des tubules (affectant moins de 10% des tubules) et nécrose au niveau cortical ; pas d'effet de protéinose, signe
- d'une altération des fonctions rénales glomérulaires et épithéliales comme cela avait été rapporté dans d'autres publications ;
- des surrénales : hémorragie ;
- du système lymphatique : nécrose des lymphocytes dans le cortex du thymus, les ganglions lymphatiques et la rate ;
- cardiaque : dégénérescence aiguë des cardiomyocytes avec cytoplasme hyperéosinophile (signe d'hypercontraction) ;
- salivaire : nécrose aiguë de l'épithélium surtout de la glande parotide mais aussi de la submandibulaire et/ou de la sublinguale.

De plus, une péritonite avec inflammation diffuse à focale de la capsule splénique et/ou hépatique et de la séreuse stomacale et /ou intestinale a été notée (Poli *et al.*, 2018).

Toxicité répétée

Les effets d'une exposition par injection i.p. à une dose sub létale de PLTX (0,25 µg.kg⁻¹ pc.j⁻¹) administrée 5 fois par semaine pendant un mois ont été évalués sur les organes lymphoïdes (thymus, rate) et le sang circulant de souris (Ito *et al.*, 1997). Au bout de la 29^e injection, neuf souris sur quinze présentent une diarrhée. Le poids du thymus diminue et des débris de

²⁹ Poissons prélevés au Japon au moment d'une prolifération d'*Ostreopsis* sp. en 1997. Les doses de PLTX ne sont pas indiquées.

lymphocytes sont observés dans son cortex. Le poids de la rate est augmenté en raison d'une exsudation fibrineuse sur la séreuse et la présence de cellules de l'inflammation (monocytes et granulocytes) à la surface et dans la pulpe rouge. De même, le nombre des mégacaryocytes sous la capsule et dans la pulpe rouge est augmenté. Des lymphocytes avec un noyau condensé sont observés dans la pulpe rouge. Le nombre de lymphocytes dans la pulpe blanche est diminué sauf dans la zone proche de l'artère centrale. Au niveau sanguin, le ratio lymphocytes / leucocytes totaux diminue après la 15^{ème} injection et de manière drastique après la 29^{ème}. De plus, une diminution des lymphocytes T et B et une augmentation des monocytes et granulocytes sont observées après la 29^{ème} injection. Après un mois de récupération, il reste encore quelques séquelles : la densité des lymphocytes dans la médulla du thymus reste plus faible que celle des témoins, des couches de matière fibreuse entourent toute la surface de la rate sans signe d'inflammation.

6.1.2.7 Toxicité par voie intraveineuse

La PLTX est extrêmement toxique après injection iv chez les mammifères (rat, lapin, chien, singe Rhésus, cochon d'Inde, souris) avec des DL₅₀ oscillant entre 0,025 et 0,45 µg.kg⁻¹ pc (Tableau VII). Les animaux meurent en quelques minutes, à la suite d'une augmentation de la pression artérielle consécutive à une vasoconstriction sévère et une insuffisance cardiaque (Ito *et al.*, 1982 ; Deeds et Schwartz, 2010). Ainsi, la mort rapide des animaux après injection i.v. de PLTX est probablement due aux spasmes intenses des muscles lisses vasculaires coronariens résultant en une diminution marquée du flux sanguin au cœur. Les mortalités plus lentes peuvent être le résultat d'une diminution du flux sanguin et de l'approvisionnement en oxygène, provoquant ischémie et à terme l'anoxie des principaux organes (Vick et Wiles, 1975).

Des chiens anesthésiés et des chats ayant reçu une dose létale de PLTX présentent des altérations du rythme cardiaque, notamment une bradycardie, des battements ectopiques et des arythmies ventriculaires (Vick et Wiles, 1975³⁰ ; Ito *et al.*, 1982³¹). Le flux sanguin dans les artères coronaires cesse, ce qui induit une ischémie myocardique et un arrêt cardiaque. Les animaux ne respirent plus, mais la mort est bien due à un arrêt cardiaque, car la ventilation artificielle ne modifie pas la dose minimale létale de PLTX chez le chien (Ito *et al.*, 1982). Chez la souris, une dilatation importante du ventricule cardiaque droit est observée *post-mortem* après administration d'une dose létale de PLTX, consécutivement à la vasoconstriction des coronaires (Moore *et al.*, 1982 ; Habermann, 1989 ; Munday, 2011).

6.1.3 *In vitro / ex vivo*

6.1.3.1 Activité cytotoxique

La PLTX n'est pas active sur les cellules bactériennes ou sur des levures, alors qu'elle est très toxique sur des cellules animales (Scheiner-Bobis *et al.*, 2002). Le test hémolytique a initialement été utilisé pour détecter la présence de composés de type PLTX. La sensibilité

³⁰ Chiens injectés avec une dose unique de 0,1 µg.kg⁻¹ pc de PLTX, ou deux doses de 0,01 µg.kg⁻¹ pc et 0,05 µg.kg⁻¹ pc PLTX (séparé par un intervalle de 2 heures à 7 jours).

³¹ PLTX à une dose 0.05 inférieure à 1 µg.kg⁻¹ pc.

des érythrocytes à la PLTX dépend de l'espèce considérée (Haberman *et al.*, 1981). L'unité hémolytique (UE) de la PLTX, définie comme la quantité de toxine nécessaire pour produire 50% d'hémolyse (CH₅₀), a été estimée à 8,00 ng. mL⁻¹ sur érythrocytes de souris (Lenoir *et al.*, 2004) et plus récemment à 0,43 ng.mL⁻¹ pour la préparation de PLTX isolée de *P. tuberculosis* du Japon (Pelin *et al.*, 2016). Un mélange de 50% PLTX et 50% 42-OH-PLTX présente une CH₅₀ très similaire de 0,46 ng. mL⁻¹ (Pelin *et al.*, 2016). Toujours sur érythrocytes de souris, une CH₅₀ de 13,2 ± 0.1 x10⁻¹² M est rapportée par Tubaro *et al.* (2011). Ainsi, la PLTX peut être considérée comme une hémolysine, car elle provoque la lyse osmotique des globules rouges et une fuite de l'hémoglobine (Habermann *et al.*, 1981). Cet effet hémolytique peut être inhibé en présence d'ouabaïne, qui est un inhibiteur spécifique de la Na⁺/K⁺-ATPase membranaire.

La PLTX s'est révélée cytotoxique pour de nombreuses autres cellules : cellules entériques gliales CRL2690 (Reale *et al.*, 2019), cellules épithéliales rénales LLC-PK1 (Mullin *et al.*, 1991), cellules de leucémie HL-60 (Fujiki *et al.*, 1986), kératinocytes HaCaT (Pelin *et al.*, 2016), cellules intestinales Caco-2 (Fessard, comm. perso, Gémin *et al.*, 2022, Valverde *et al.*, 2008a), cellules pulmonaires A549 (Fessard, comm. perso), neuroblastomes BE(2)-M17 (Valverde *et al.*, 2008b) et Neuro2A (Fessard, comm. perso), fibroblastes 3T3 (Wattenberg *et al.*, 1989a). La cytotoxicité est caractérisée par un gonflement cellulaire (Reale *et al.*, 2019, Mullin *et al.*, 1981) avec la perte de neurites pour les cellules gliales (Reale *et al.*, 2019). La lyse cellulaire est associée à l'apparition de ce gonflement et d'excroissances membranaires qui n'éclatent pas mais qui se dilatent (Schilling *et al.*, 2006). Les cellules s'arrondissent, présentent une dépolymérisation des microfilaments d'actine et se détachent du substrat (Valverde *et al.*, 2008a et b).

La mort cellulaire est de type nécrose alors que l'apoptose ne semble pas impliquée, ou bien de manière secondaire (Valverde *et al.*, 2008a ; Reale *et al.*, 2019). Cette toxicité apparaît à de très faibles concentrations (dans la gamme du nM) et est observée très rapidement, après seulement 15 min à 1 h de contact. La partie N-terminale et la région hydroxyle de la molécule est importante pour la cytotoxicité puisque celle-ci est 100 fois moins importante avec 3 molécules différentes de PLTX modifiées à ces niveaux (Wattenberg *et al.*, 1989).

Les données sur la toxicité cardiovasculaire de la PLTX obtenues *in vivo* sont confirmées par la vasoconstriction irréversible observée *ex vivo* sur cœur perfusé de cobaye (Kaul *et al.*, 1974) et le fait que l'injection de vasodilatateurs dans le cœur offre une protection contre l'administration de PLTX (Vick et Wiles, 1975). À l'échelle cellulaire et moléculaire, la PLTX est susceptible d'agir directement sur les cellules des muscles lisses des vaisseaux où elle produit une vasoconstriction via son interaction avec la Na/K-ATPase membranaire (voir section mécanisme d'action) (Wu, 2009). Un tel mécanisme est retrouvé *in vitro* sur des cellules musculaires lisses d'artère coronaire de chien, qui se contractent après addition de la PLTX (Ito *et al.*, 1976). Sur des fibres cardiaques isolées, la PLTX provoque une dépolarisation (Sauviat *et al.*, 1987 ; Sauviat, 1989). Ainsi, les cardiomyocytes exposés à la PLTX montrent une dépolarisation progressive de la membrane au repos avant un arrêt complet et irréversible des potentiels d'action et de l'activité contractile (Del Favero *et al.*, 2013). Les mêmes effets sont retrouvés au niveau de fibres nerveuses myélinisées de grenouille à une concentration de 3.10⁻⁸ M de PLTX (Dubois et Cohen, 1977).

Sur une monocouche de cellules épithéliales rénales LLC-PK1, la PLTX (1 nM) provoque une diminution rapide de la résistance transépithéliale qui est irréversible, même si la PLTX est éliminée après 90 min de contact. Cependant, cette diminution n'est pas corrélée avec une augmentation de perméabilité (mesurée par le passage du mannitol) jusqu'à 3h de traitement.

La PLTX ne provoque pas un effet spécifique sur les jonctions serrées, comme le font les inhibiteurs de la protéine kinase C, mais elle provoque une cytotoxicité irréversible caractérisée par un gonflement cellulaire et une altération des niveaux intracellulaires en Na⁺ et en K⁺. Ceci entraîne une dépolarisation prononcée de la couche de cellules si la PLTX est ajoutée du côté basal et une hyperpolarisation si la toxine est ajoutée du côté apical (Mullin *et al.*, 1981).

Des altérations de la perméabilité d'un modèle de barrière intestinale *in vitro* (monocouche de cellules Caco-2) ont été observées après exposition à la PLTX (Fernández *et al.*, 2013 ; Gémin *et al.*, 2022).

Toxicité sur l'épithélium nasal humain reconstitué

Des résultats préliminaires ont été obtenus dans le projet ANR Ocean15 sur des épithéliums nasaux MucilAir (Epithelix) (Fessard, communication personnelle). Il faut cependant souligner que chaque concentration n'a été testée que sur un épithélium (pas de réplicat). Les épithéliums ont été traités en apical avec 30 µL de PLTX à 100 pM, 1 nM et 10 nM diluée dans du NaCl complet (0,9% NaCl – 1,25 mM CaCl₂ – 10 mM HEPES) pendant 24 heures. Le suivi de la viabilité, la fréquence du battement ciliaire, la clairance muco-ciliaire, la réponse inflammatoire (relargage d'IL8), l'intégrité de la barrière n'a pas permis de détecter d'effets provoqués par la PLTX. Cependant, des analyses histologiques montrent des modifications de l'épithélium. Ainsi, la présence de cellules avec un cytoplasme très éosinophile et rétracté, compatible avec des cellules en apoptose, est observée pour les 3 concentrations testées. À 10 nM, l'épithélium est sévèrement affecté et multistratifié avec des cellules qui présentent au pôle apical des cils désorganisés. On note également des cellules ayant un cytoplasme pâle, légèrement micro-vacuolisé, et des hémidesmosomes visibles (oedème intra- et intercellulaire). Dans le segment sévèrement affecté, on observe de petites cellules caliciformes, fusiformes, immatures et disposant d'une petite vacuole sécrétoire.

Réponse inflammatoire

Les effets pro-inflammatoires de la PLTX observés après une exposition par inhalation et/ou par contact cutané seraient dus à l'augmentation des niveaux d'ARNm codant pour des cytokines pro-inflammatoires dans les macrophages humains (Crinelli *et al.*, 2012). Une réponse inflammatoire évaluée par la sécrétion d'IL-8 a aussi été observée après 24 h de traitement d'une monocouche de cellules intestinales Caco-2 avec des concentrations de PLTX allant de 3,13 à 12.5 ng.mL⁻¹ (Gémin *et al.*, 2022).

6.1.3.2 Toxicité neuronale et musculaire

La PLTX induit des effets vasoconstricteurs. Des travaux *ex vivo* ont montré qu'elle pouvait provoquer la contraction de muscles lisses de la trachée (Robinson et Franz, 1991) ou des vaisseaux sanguins (aorte, artères coronariennes et mésentériques) (Ito *et al.*, 1976 ; Robinson, 1992). Cet effet est provoqué par la libération de neurotransmetteurs excitateurs par les neurones, ce qui favorise la contraction des muscles lisses de jonctions neuromusculaires de rat. La déplétion vésiculaire observée indique une vidange des neurotransmetteurs, à l'origine de l'activité spasmodique de la PLTX (Amir *et al.*, 1997). La PLTX peut également induire la libération de prostaglandines et dépolariser la membrane des cellules musculaires lisses, ce qui induit une contraction (Karaki *et al.*, 1988). La PLTX induit

une augmentation transitoire de Ca^{2+} intracellulaire au niveau de cellules de muscle squelettique de souris (Del Favero *et al.*, 2012). Cette augmentation est due à la mobilisation de Ca^{2+} des réserves du réticulum sarcoplasmique et à l'entrée de Ca^{2+} favorisée par la dépolarisation et l'activation de l'échangeur $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ en mode inverse. De nombreux effets de la PLTX sont en effet induits par une augmentation du Ca^{2+} dans les cellules (contraction musculaire et libération de médiateurs chimiques). Au niveau des synapses neuromusculaires, aussi bien des muscles squelettiques que lisses, la PLTX exerce des effets pré- et postsynaptiques, c'est à dire sur les neurones et sur les fibres musculaires respectivement. Dans l'artère caudale du rat, la PLTX stimule les nerfs adrénergiques et libère de la noradrénaline (Karaki *et al.*, 1988).

La PLTX induit la libération de noradrénaline de cellules neuroendocrines de rat (Tatsumi *et al.*, 1984), de l'aorte de lapin (Nagase et Karaki, 1987), de l'artère caudale isolée de rat (Karaki *et al.*, 1988), et la libération d'adrénaline/noradrénaline à partir de cellules chromaffines de glandes surrénales de bœuf (Nakanishi *et al.*, 1991 ; Yoshizumi *et al.*, 1991a). La libération de noradrénaline induite par des concentrations nanomolaires de PLTX est abolie dans un milieu sans Na^+ , ce qui n'est pas vérifié pour des concentrations micromolaires (Meunier *et al.*, 2009).

6.1.3.3 Potentiel mutagène/génotoxique

Le pouvoir mutagène de la PLTX a été évalué par le test d'Ames, en utilisant les souches de *Salmonella typhimurium* (TA 98 et TA 100), avec ou sans activation métabolique. La PLTX n'exerce pas d'effet mutagène (Pagnon *et al.*, 2008). De plus, elle n'agit pas comme initiateur dans le test de transformation *in vitro* des cellules BALB/c 3T3, ou sur la peau de souris *in vivo* (Fujiki *et al.*, 1986 ; Miura *et al.*, 2006 ; Munday, 2011). Cependant, elle agit comme promoteur de tumeurs cutanées, indépendamment de l'activation de la protéine kinase C, comme le montrent les études de cancérogenèse à moyen terme sur la peau de souris (Fujiki *et al.*, 1986 ; Munday, 2011).

6.1.4 Mécanisme d'action

Au niveau cellulaire, la toxicité du PLTX s'explique par une dépolarisation de la membrane cellulaire, consécutive à son interaction avec la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$. Cette pompe est un transporteur qui assure le transfert transmembranaire des ions Na^+ et K^+ contre leurs gradients. Ainsi elle est responsable d'un échange de 3 ions Na^+ cytoplasmiques contre 2 ions K^+ extracellulaires en consommant une molécule d'ATP (Figure 30). La phosphorylation est médiée par l'ATP, suivie par une auto-déphosphorylation qui génère des changements de conformation de l'enzyme permettant l'accès simultané des ions aux sites de liaison de la pompe d'un côté de la membrane. La $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ est localisée du côté basolatéral de la plupart des cellules épithéliales des mammifères et est impliquée dans diverses pathologies (Vadász *et al.*, 2007 ; Clausen *et al.*, 2017 ; Silva *et al.*, 2021). La pompe agit comme un canal ionique avec deux entrées fermement couplées qui sont contraintes de s'ouvrir et de se fermer alternativement. La PLTX perturbe ce couplage transformant temporairement la pompe en un canal ionique (Takeuchi *et al.*, 2009). Les cations monovalents (Na^+ , K^+) peuvent passer à travers ce canal ionique ; les cations divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+}) ne le peuvent pas (Scheiner-Bobis

et al., 2002). Le site de liaison de la PLTX à la Na/K-ATPase n'a pas encore été clairement identifié.

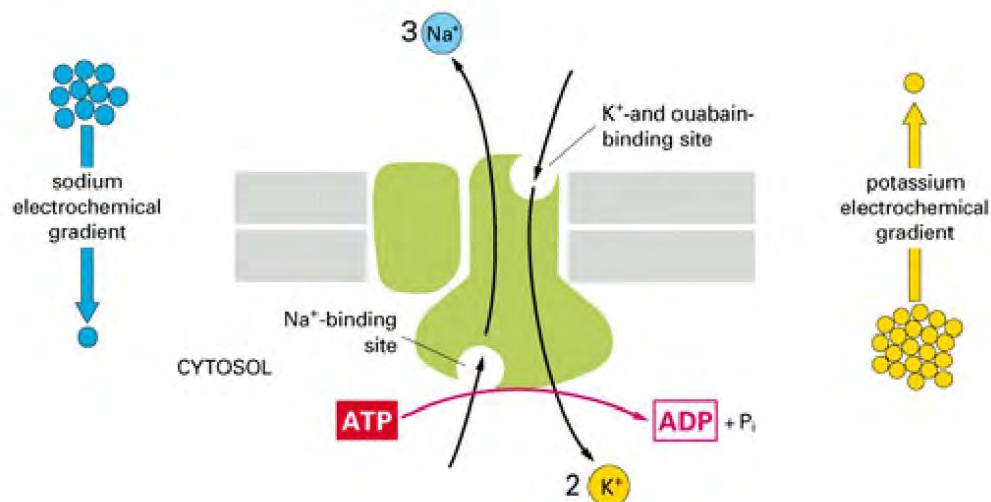


Figure 30 : Schéma du fonctionnement de la pompe Na/K-ATPase

(Source Alberts *et al.*, 2008)

La pompe Na/K-ATPase est un hétéro-complexe protéique composé de plusieurs sous-unités dont le profil d'expression diffère selon les tissus, voire selon le sexe et l'âge. Les résultats de Pelin *et al.* (2020) indiquent que l'expression de certaines sous-unités induirait une plus grande sensibilité à la PLTX et suggèrent une variabilité individuelle de réponse suite à une exposition à la PLTX.

Un traitement des kératinocytes HaCaT avec la PLTX provoque une augmentation concentration dépendante des ions superoxydes mais le stress oxydant n'est pas le mécanisme principal de toxicité (Pelin *et al.*, 2013). En fait, l'augmentation de Na⁺ intracellulaire provoquerait une augmentation du différentiel de pH au niveau de la membrane interne des mitochondries, à l'origine de la production d'ions superoxydes, en inversant le transport de la chaîne d'électrons.

Le déséquilibre ionique provoqué par la PLTX avec l'augmentation intracellulaire du Na⁺ va entraîner en réaction une activation des échangeurs Na⁺/Ca²⁺ et Na⁺/H⁺ en mode inversé. Ceci peut conduire à une acidification de milieu intracellulaire par l'augmentation en ions H⁺ (Rossini et Sala, 2012). L'augmentation en Ca²⁺ intracellulaire, qui provient du Ca²⁺ extracellulaire et non des réserves intracellulaires (Schilling *et al.*, 2006), provoque de nombreux effets cellulaires, notamment une altération de l'intégrité des filaments d'actine du cytosquelette et des perturbations morphologiques qui y sont liées

Parallèlement, la PLTX favorise la sécrétion de catécholamines et d'autres neurotransmetteurs, *via* l'influx de Ca²⁺. *In vitro*, la PLTX (1 nM-1µM) induit la libération de catécholamines dans des cellules endocrines de mammifères d'une manière concentration-dépendante (Tatsumi *et al.*, 1984 ; Yoshizumi *et al.*, 1991b). De faibles concentrations de PLTX (10⁻¹⁰ M) appliquées sur des synaptosomes cérébrocorticaux de rat provoquent une dépolarisation résultant d'une augmentation de la perméabilité aux ions Na⁺ *via* des canaux sodium insensibles à la tétrodoxtine (TTX). Cette dépolarisation membranaire induit un influx de Ca²⁺ et la libération d'acétylcholine. Des concentrations de PLTX plus élevées (10⁻⁶ M)

provoquent une libération d'acétylcholine sans augmenter directement l'influx de Ca^{2+} , mais en agissant cette fois sur la mobilisation de Ca^{2+} des réserves internes du réticulum endoplasmique (Sato et Nakazato, 1991).

Des expériences *ex vivo* montrent une plus grande sensibilité de la partie distale du côlon à la PLTX comparée à la partie proximale. Cela s'expliquerait par l'effet de la PLTX sur la H/K-ATPase, la convertissant apparemment en canal, la plus forte concentration de H/K-ATPase se trouvant au niveau distal de l'intestin (Scheiner-Bobis *et al.*, 2002). En effet, les deux types de pompes (Na/K-ATPase et H/K-ATPase) présentent une forte homologie (Scheiner-Bobis *et al.*, 2002). Cependant, aucun effet de la PLTX sur la H/K-ATPase humaine non gastrique n'a été rapporté, probablement en raison de l'absence de 40 acides aminés dans la région N-terminale comparé à la Na/K-ATPase, qui contiendrait donc le site de liaison de la PLTX et de l'ouabaïne (Guennoun-Lehmann *et al.*, 2007). Il semblerait que les 2 extrémités de la molécule de PLTX interagissent avec la Na/K-ATPase, notamment au niveau des globules rouges pour induire un effet hémolytique (Tosteson *et al.*, 1995).

6.1.5 Conclusion

La toxicité aiguë de la PLTX a été étudiée chez de nombreuses espèces animales (très majoritairement rongeurs, mais également lagomorphes, chiens, singes) et pour plusieurs voies d'administration. Même si l'exposition par voies cutanée et oculaire ne doit pas être sous-estimée, l'exposition humaine à la PLTX se fait très majoritairement par inhalation d'aérosols toxiques et par ingestion d'organismes marins, principalement des fruits de mer contaminés, et les effets rapportés par ces deux voies d'exposition ont donc été plus particulièrement détaillés.

La toxicité de la PLTX est bien plus importante par inhalation/instillation intratrachéale que par gavage (DL_{50} environ 15 000 fois plus faible, selon les études), probablement en raison d'une dégradation le long du tractus digestif, et/ou d'une faible absorption au niveau du tractus digestif. De plus, l'administration sublinguale est plus toxique que par gavage et l'absorption de la PLTX dès la muqueuse buccale est fort probable compte tenu des effets délétères observés sur les poumons et d'autres organes internes. Cependant, la toxicité aiguë par inhalation est très similaire à celle des voies parentérales classiques. Les données disponibles sur l'exposition aiguë à la PLTX par inhalation montrent des effets sévères non seulement sur les voies respiratoires hautes et profondes mais également au niveau systémique.

Les symptômes externes observés dans les différents modèles expérimentaux sont principalement : une détresse respiratoire (difficultés à respirer, hyperventilation, dyspnée) ; des signes de paralysie musculaire parfois précédés de spasmes, une pilo-érection, des effets cardiovasculaires (bradycardie, arythmie, vasoconstriction) par la voie intraveineuse, des signes sensoriels (grattage) et des effets d'irritation localisés (par application topique ou intradermique).

La cinétique d'apparition et la nature des symptômes diffèrent en fonction des voies d'administration.

Des altérations histologiques sont également observées sur de nombreux organes. Certains résultats montrent une réversibilité pour certains effets (poumons, foie, rein, cœur, estomac, intestins, pancréas, glandes surrénales, thymus, rate) et indépendamment de la voie

d'administration : inflammation, érosion des épithéliums, congestion vasculaire, dégénérescence et nécrose.

Des altérations histologiques sont également observées : inflammation, lésions dans la cavité viscérale (poumons, foie, rein, cœur, estomac, intestins, pancréas, glandes surrénales, thymus, rate), lésions nécrotiques, effets locaux marqués (instillation intraoculaire).

Des perturbations biochimiques sont relevées comme une augmentation des concentrations de certains marqueurs plasmatiques (CPK, LDH, AST, ALT) et une perturbation non systématique des électrolytes sanguins (natrémie, kaliémie, chlorémie).

La toxicité orale par administrations répétées de la PLTX a fait l'objet de plusieurs études sur rongeurs. Il en ressort : une perte d'appétit, une altération de la coordination motrice, une léthargie, une paralysie musculaire, une détresse respiratoire, des lésions histologiques (poumons, cœur, foie, tractus digestif, thymus), des modifications non systématiques de paramètres biochimiques (ALT, AST, LDH et CK) et une diminution de la natrémie et une augmentation de la kaliémie. Certains résultats montrent une réversibilité pour certains effets.

La PLTX provoque une détresse respiratoire menant à la mort rapide (quelques heures) des animaux quelle que soit la voie d'administration. Cet effet pourrait avoir plusieurs origines, périphérique par blocage du diaphragme ou centrale par perturbation de l'activité neuronale bulbaire. La toxicité de la PLTX observée sur des temps plus longs (plusieurs heures) est associée à des effets sur divers organes : poumons, tractus gastro-intestinal, cœur, pancréas, foie, tissus lymphoïdes (rate, thymus, ganglions lymphatiques) et reins. Quelle que soit la voie d'administration, peu de données cinétiques sur l'absorption et la distribution (informations non quantitatives) sont disponibles, et il n'y a aucune donnée sur la métabolisation et l'excrétion. Peu de données sont disponibles sur la toxicité par administrations répétées de la PLTX par voie orale et aucune par inhalation ou instillation nasale ou trachéale.

Les données actuelles suggèrent que la PLTX n'est pas génotoxique, mais un promoteur tumoral avéré. Il n'existe aucune donnée sur le caractère reprotoxique ou tératogène de la PLTX. De même, aucune étude ne s'est penchée sur sa toxicité chronique.

D'un point de vue mécanistique, la cible moléculaire de la PLTX est la pompe Na^+/K^+ -ATPase, protéine membranaire ubiquitaire de tous les types cellulaires de l'organisme. En s'y fixant, la PLTX convertit cette pompe en un canal cationique. Cependant, d'autres pompes présentant de fortes homologies, comme la H/K-ATPase, pourraient être aussi des cibles potentielles de la PLTX. Les symptômes observés *in vivo* avec la PLTX seraient donc majoritairement attribuables à l'interaction de la PLTX avec cette pompe Na/K-ATPase.

6.2 Toxicité de la 42-OH-PLTX

6.2.1 Cinétique

Aucune donnée de cinétique *in vivo* ou *in vitro* concernant la 42-OH-PLTX n'est publiée. Néanmoins, il semble que cette toxine puisse être absorbée à travers les barrières pulmonaire et intestinale et se distribuer dans différents organes compte tenu des altérations observées au niveau systémique (rein, foie, tissus lymphoïdes) lors des études de toxicité par inhalation (Poli *et al.*, 2018) et par gavage (Tubaro *et al.*, 2011b). Cependant, il n'a pas été montré si le

passage de la toxine était consécutif à une altération de la perméabilité des épithéliums. Quelle que soit la voie d'administration, aucune donnée sur le passage des barrières biologiques telles que cutanée, hémato-encéphalique, testiculaire et placentaire n'est disponible. Il en est de même pour le métabolisme et pour l'excrétion.

6.2.2 *In vivo*

6.2.2.1 Inhalation

Une seule étude s'est intéressé à cette voie d'exposition (Poli *et al.*, 2018). La DL_{50} par inhalation (par le nez directement, 15 à 20 min d'exposition, moyenne des diamètres aérodynamiques médians de masse = $2,12 \pm 0,01 \mu\text{m}$) de la 42-OH-PLTX (isolée de *Palythoa toxica* d'Hawaï) sur des rats Fischer femelles est de $0,045 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ pc}$ (intervalle de confiance 95% de $0,037$ à $0,055 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ pc}$) (Poli *et al.*, 2018). Sur les seize rats traités avec $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et non euthanasiés juste après le traitement, tous ont succombé ou ont été euthanasiés 12 h post-exposition. Immédiatement après le traitement, deux rats sur quatre présentent une hémorragie au niveau de la cavité nasale, dont un animal avec des hémorragies aiguës au poumon mais qui ne sont probablement pas liées à la 42-OH-PLTX. Douze heures après exposition, tous les rats montrent une nécrose et une dégénérescence de l'épithélium nasal et un fluide protéique abondant dans la lumière, souvent associé à une hémorragie et une inflammation à neutrophiles. De même les rats présentent des lésions pulmonaires évidentes (exsudation de fibrine dans la lumière alvéolaire, œdème interstitiel et alvéolaire, augmentation des macrophages alvéolaires et léger influx de neutrophiles dans les alvéoles). Les épithéliums des bronches, des bronchioles et des septa alvéolaires montrent des nécroses. Au niveau hépatique, une congestion marquée de la zone centro-lobulaire est accompagnée parfois d'une dégénérescence vacuolaire des hépatocytes sans signe de nécrose.

Des altérations sont également observées dans les tissus lymphoïdes (déplétion, nécrose de lymphocytes) ainsi qu'au niveau cardiaque (dégénérescence légère des cardiomyocytes du ventricule droit mais sans inflammation). Enfin des dégénérescences légères et des nécroses occasionnelles sont détectées au niveau de l'épithélium rénal tubulaire et des glandes salivaires principalement la submandibulaire. Cependant, les changements histologiques au niveau rénal restent légers avec vacuolisation, gonflement cytoplasmique, occasionnellement pycnoses nucléaires et détachement de la membrane basale. Globalement, les effets observés sont très similaires à ceux relevés avec la PLTX. Les données sont compilées dans le Tableau XIX de l'annexe 2.

6.2.2.2 Ingestion

La DL_{50} de la 42-OH-PLTX administrée par gavage est, d'après calcul, de $651 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ pc}$ (intervalle de confiance 95% : 384 - $1018 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ pc}$). La dose la plus faible testée dans cette étude ($300 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ pc}$) induit la mort d'une souris sur cinq et de la totalité des souris à la plus forte dose ($1697 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ pc}$). Les souris mourant dans les 24 h montrent des signes d'intoxication sévères, progressifs et irréversibles. 40% des souris se grattent, présentent des sauts (70%), un stress respiratoire et une cyanose (30%). Finalement, juste avant la mort, la paralysie des membres inférieurs est observée chez 80% des souris. Les temps de survie ne sont pas reliés à la dose. La mort a lieu dans les 2 h après l'apparition des signes cliniques

(Tubaro *et al.*, 2011b). Au niveau de l'épithélium gastrique, des foyers de zones rouges apparaissent indépendamment de la dose (1/5 souris à 300 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc, 2/5 à 1200 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc et 1/5 à 1697 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc). Il n'y a pas de lésions macroscopiques observées chez les animaux sacrifiés à la fin de l'étude. Des augmentations marquées dose dépendantes des niveaux plasmatiques en LDH (42–248%) et AST (88–232%) sont mesurées pour des doses ≥ 600 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc. Des augmentations modérées à marquées sont aussi observées pour ALT (132–176%), CPK (66–478%), et K^+ (15–97%) pour les souris traitées avec 848 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc. Aucun changement des formules leucocytaires ni des niveaux plasmatiques en créatinine, Na^+ et hémoglobine n'a été observé (Tubaro *et al.*, 2011b).

6.2.2.3 Injection intrapéritonéale

La DL_{50} par voie i.p. de la 42-OH-PLTX sur des rats Fischer femelles est de 1,93 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc (intervalle de confiance 95% de 1,07 à 4,65). Un mélange 50/50 de PLTX et 42-OH-PLTX montre une toxicité plus importante de 0,92 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc (intervalle de confiance 95% entre 0,54 et 1,54) (Poli *et al.*, 2018).

Dans cette étude, cinq lots de huit rats ont été exposés à une dose de 42-OH-PLTX : 0,25, 0,5, 1,0, 2,5, and 5,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc et observés pendant 7 jours. Sur ce total- des quarante rats exposés, quinze n'ont pas survécu jusqu'à la fin de l'étude dont neuf ont été euthanasiés 4h après l'administration. Cinq rats sont morts entre 24 et 28 h et un rat a été euthanasié à 28 h. Vingt-cinq rats ont survécu jusqu'à la fin de l'étude dont seize ont été analysés pour l'histologie. Quatre des cinq rats morts entre 24 et 28h montrent la présence de fibrine avec hémorragie dans les poumons. Les cinq rats ainsi que celui euthanasié montrent des nécroses aiguës coagulatives des hépatocytes dans le foie. Celles-ci sont multifoyers mais proches des vaisseaux sanguins centrolobulaires. Cinq rats présentent également une dégénérescence de l'épithélium des tubules rénaux, souvent avec nécrose et dépôt protéique. Chez quatre rats il est observé un infarctus aigu unilatéral et une nécrose de la glande surrénale tandis qu'un rat présente une hémorragie aiguë adrénocorticale. De plus, ces rats montrent une déplétion des organes lymphoïdes (thymus, nodules lymphatiques et/ ou rate) ainsi qu'une nécrose lymphocytaire. Toutes ces lésions aux niveaux hépatique, rénal, surrénal et lymphatique ne sont pas observées ni chez les rats survivants ni chez ceux euthanasiés après quelques heures. Des altérations au niveau de l'oreille moyenne sont rapportées : chez les rats ayant succombé, des hémorragies uni- ou bilatérales et, chez des survivants, un large thrombus de fibrine. La plupart des rats survivants ou non présentent une péritonite manifeste par l'inflammation diffuse ou locale des capsules spléniques et ou hépatiques, et/ou de la séreuse de l'estomac et/ou de l'intestin. De plus, cinq des quinze rats n'ayant pas survécu montrent une nécrose aiguë de l'épithélium des glandes salivaires, le plus souvent de la parotide, mais aussi de la sous-mandibulaire et de la sublinguale. Chez plusieurs survivants (9/16), des marques évidentes de régénération de l'épithélium salivaire sont notées. L'observation des ganglions lymphatiques chez les animaux n'ayant pas survécu signale une hémorragie et/ou une hémorragie drainante, spécialement dans la zone thoracique.

6.2.3 *In vitro*

L'effet hémolytique de la 42-OH-PLTX a été évalué sur des érythrocytes de souris. Pour cette toxine isolée de *Palythoa toxica* d'Hawaï, la CH_{50} (unité hémolytique) a été estimée à 0,37

ng.mL⁻¹ (Poli *et al.*, 2018). Selon Tubaro *et al.* (2011b), la CH₅₀ de 7,6 ± 0,5 10⁻¹² M est un peu plus faible que celle de la PLTX (CH₅₀ = 13,2 ± 0,1 10⁻¹² M).

Le GT n'a pas identifié de données sur d'autres systèmes cellulaires ou tissulaires publiées avec la 42-OH-PLTX.

6.2.4 Mécanisme d'action

Le GT n'a pas identifié d'étude relative au mécanisme d'action de la 42-OH-PLTX.

6.3 Toxicité des ovatoxines

Contrairement aux études de toxicité sur PLTX isolée de *Palythoa*, celles sur les OVTX produites par *Ostreopsis cf. ovata* sont rares du fait de l'absence de commercialisation et de la difficulté de leur obtention par purification à partir de cultures en laboratoire (Gémin, 2020).

6.3.1 Cinétique

Le GT « *Ostreopsis* » n'a pas identifié d'étude présentant des données de cinétique *in vivo* ou *in vitro* concernant les OVTX. Néanmoins, compte tenu des atteintes systémiques observées lors des études de toxicité par inhalation (Poli *et al.*, 2018), il semble que l'OVTX-a (probablement forme AC) (isolée de culture d'*Ostreopsis ovata* japonaise) puisse passer la barrière pulmonaire et se distribuer dans différents organes. Cependant, il n'est pas possible d'évaluer si ce passage s'effectue en absence d'altération de la perméabilité de cet épithélium.

Au cours du projet ANR Ocean15, des études *in vitro* ont été réalisées pour évaluer le passage de la barrière intestinale des OVTX-a et -d (purifiées à partir d'une souche d'*O. cf. ovata* de Méditerranée), en utilisant un modèle cellulaire de type entérocytaire (cellules intestinales humaines Caco-2 différenciées sur inserts) (Gémin *et al.*, 2022). Cependant, les paramètres cinétiques de passage n'ont pas pu être déterminés en raison des concentrations de toxines très faibles utilisées ne permettant pas leur quantification ultérieure. Malgré tout, des altérations de l'intégrité de la monocouche épithéliale ont été observées avec des concentrations d'OVTX-a dès 2,5 ng.mL⁻¹ (environ 1 nM) après 24h d'exposition alors qu'aucun effet sur l'intégrité de la monocouche de cellules Caco-2 n'a été observé jusqu'à 5 ng.mL⁻¹ d'OVTX-d.

6.3.2 *In vivo*

6.3.2.1 Inhalation instillation intranasale

Toxicité aiguë

La DL₅₀ par inhalation (par le nez directement, 15 à 20 min d'exposition, moyenne des diamètres aérodynamiques médians de masse = 1,05 ± 0,01 µm) sur des rats Fischer femelles est de 0,031 µg.kg⁻¹ pc (intervalle de confiance 95% de 0,025 à 0,039) pour l'OVTX-a purifiée (probablement forme AC) (isolée de culture d'*Ostreopsis ovata* japonaise) (Poli *et al.*, 2018). Sur les vingt rats exposés à l'OVTX-a, quatre rats ont survécu au-delà de 48 h. Immédiatement

après l'exposition, aucune lésion histologique n'est observée mais des altérations sont visibles après 12 h. À 24 h, tous les rats présentent des lésions dans les poumons, les fosses nasales, le foie, la partie droite du cœur, les tissus lymphoïdes et les glandes salivaires. En général, la sévérité des altérations augmente jusqu'à 48 h mais des marques de réparation sont également observées.

Au niveau pulmonaire, des lésions apparaissent après 12 h avec de petites quantités de fibrine dans la lumière alvéolaire, l'inflammation à neutrophiles dans la lumière alvéolaire et les espaces interstitiels, l'augmentation des macrophages alvéolaires, un exsudat à neutrophiles dans les bronches et bronchioles, la nécrose de l'épithélium, ainsi que des œdèmes périvasculaires et interstitiels. La nécrose des alvéoles et/ou des pneumocytes alvéolaires est présente mais rare. À 24 h, chez tous les rats, il y a un exsudat de fibrine plus étendu (environ 50% des poumons), une nécrose souvent diffuse (marquée à sévère) de l'épithélium de la muqueuse des voies respiratoires moyennes et grandes, une nécrose des septa alvéolaires avec hémorragie locale et une inflammation à neutrophiles intense, avec présence de neutrophiles en dégénérescence dans les zones de nécrose (inflammation suppurée), et un œdème marqué et généralisé au niveau pulmonaire et interstitiel. À 36 h, la gravité des lésions tissulaires et l'inflammation des poumons est, en général, plus sévère. À 48 h, les lésions pulmonaires, impliquant souvent plus de 90 % de chaque lobe pulmonaire, sont plus sévères, en particulier l'intensité de l'inflammation et la destruction des tissus. Tous les rats présentent un dépôt de fibrine, une inflammation et une nécrose. Les dépôts de fibrine montrent des signes histologiques de polymérisation (maturation). Des signes de réparation tels qu'une hyperplasie épithéliale dans les voies respiratoires et une hyperplasie pneumocytaire de type 2 dans les alvéoles sont également observées.

Dans la cavité nasale, trois rats sur quatre montrent une augmentation du liquide protéique luminal (mucine) et un rat une légère dégénérescence épithéliale avec un exsudat à neutrophiles à 12 h. À 24 h, en particulier dans la cavité nasale caudale, il y a une nécrose étendue multifocale à focale et une dégénérescence de l'épithélium, et la présence d'un exsudat et d'un fluide luminal abondants. Chez trois des quatre rats, au niveau de la trachée, on observe un exsudat cellulaire dans la lumière et des neutrophiles. À 48 h, tous les rats montrent une dégénérescence/nécrose de l'épithélium de la cavité nasale mais des signes de récupération sont notés comme l'hyperplasie des cellules à mucus.

Au niveau hépatique, dès 12 h, une congestion marquée de la zone centro-lobulaire a été observée chez 3 rats sur 4, sans changements histologiques significatifs des hépatocytes, le dernier rat montrant une congestion hépatique diffuse. À 24 h, une congestion centro-lobulaire est observée chez tous les rats, mais en plus, une dégénérescence vacuolaire des hépatocytes centro-lobulaires, pouvant être accompagnée de changements histologiques précoces suggérant une nécrose, est rapportée pour deux des quatre rats. À 36 h, les lésions tissulaires et l'inflammation du foie sont, en général, plus sévères. Ainsi, deux des quatre rats présentent une nécrose diffuse sévère des hépatocytes centro-lobulaires, qui n'a pas été détectée dans les temps plus courts. Pour les 2 autres rats, l'un montre une dégénérescence des hépatocytes et une nécrose, similaires à ce qui a été rapporté à 24 h, et l'autre montre des lésions minimales autres que de la congestion centro-lobulaire. À 48 h tous les rats présentent une congestion hépatique centro-lobulaire avec soit une dégénérescence soit une nécrose marquée des hépatocytes centro-lobulaires pour respectivement un et trois des rats.

Pour ce qui concerne les tissus lymphoïdes, dès 12 h, tous les rats présentent une nécrose lymphocytaire minime à légère et/ou une apoptose des lymphocytes (lymphocytolyse) et/ou

une déplétion légère/minime dans un ou plusieurs tissus lymphoïdes examinés (thymus, ganglion mésentérique et/ou ganglion mandibulaire). Dans le cortex thymique, un pourcentage élevé (50 à 75 % estimé) de lymphocytes sont nécrotiques à 24 h, une nécrose sévère mais diffuse est rapportée à 36 h pour tous les rats, suivie d'une déplétion sévère à 48 h.

Au niveau cardiaque, à 12 h, chez trois rats sur quatre, une dégénérescence précoce minime à légère et une nécrose aiguë des cardiomyocytes au niveau de la paroi et de muscles papillaires sont observées. Les lésions histologiques dans le cœur sont caractérisées par des cytoplasmes éosinophiles et des pycnoses nucléaires avec précipitation minérale cytoplasmique occasionnelle. À 24 h, dans le ventricule droit du myocarde et les muscles papillaires, des foyers de dégénérescence et de nécrose ont été observés, souvent avec des infiltrations d'un faible nombre de neutrophiles et d'histiocytes.

À 12 h, les canaux de la glande salivaire sous-maxillaire présentent une dégénérescence/nécrose épithéliale chez deux des quatre rats examinés. À 36 h, cette dégénérescence touche les quatre rats ; de plus deux rats montrent aussi une nécrose des cellules d'acini des glandes salivaires parotides. À 48 h, deux des quatre rats montrent une légère dégénérescence des canaux des glandes salivaires et des signes de récupération sont visibles.

Des lésions dans les reins sont observées à 36 h : deux rats présentent une dégénérescence (gonflement) du cortex épithélium tubulaire et l'un de ces rats montre une nécrose individuelle des cellules épithéliales et une légère protéinose. À 36 h également, une légère dégénérescence/nécrose focale des muscles squelettiques du membre postérieur est observée pour un des rats. Des lésions dans le tractus gastrointestinal et certains muscles squelettiques (dégénération et nécrose) sont très rarement vues et qualifiées de légères à mineures par les auteurs chez le peu d'animaux affectés.

Les données sont compilées dans le Tableau XX de l'annexe 2.

Toxicité par administrations répétées

Le GT n'a pas identifié d'étude de toxicité concernant des administrations répétées par inhalation/instillation intranasale ou intratrachéale d'OVTX.

6.3.2.2 Ingestion

Toxicité aiguë

Le GT n'a pas identifié d'étude de toxicité aiguë par ingestion d'OVTX.

Toxicité par administrations répétées

Le GT n'a pas identifié d'étude de toxicité concernant des administrations répétées par ingestion d'OVTX.

6.3.2.3 Topique

Le GT n'a pas identifié d'étude de toxicité topique avec des OVTX.

6.3.2.4 Oculaire

Le GT n'a pas identifié d'étude de toxicité oculaire avec des OVTX.

6.3.2.5 Injection intrapéritonéale

Une légère différence du degré de toxicité (facteur inférieur à 2) entre la PLTX et l'OVTX-a (i.e. plus précisément un mélange d'OVTX contenant majoritairement de l'OVTX-a) a été publiée récemment avec une DL50 par injection i.p. chez le rat de 1,8 et 3,26 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc pour la PLTX et l'OVTX-a respectivement (Poli *et al.*, 2018).

L'absence de lésions histologiques est observée chez les animaux morts dans les 4 h après l'injection (8 animaux sur 9). Le seul animal ayant survécu plus de 20 h présente des lésions dans plusieurs organes/tissus similaires à celles rapportées avec la PLTX et la 42-OH-PLTX : hémorragie et fibrine dans la lumière alvéolaire des poumons, infarctus des glandes surrénales, nécrose aiguë des lymphocytes dans le thymus et la rate, nécrose et dégénérescence des acini des glandes salivaires submandibulaire et parotide. Six animaux présentent une dégénérescence aiguë et multifocale des cardiomyocytes. Neuf des dix-huit animaux survivants montrent une inflammation du mésentère et des capsules splénique et/ou hépatique. Une petite augmentation de cardiomyocytes hypercontractés et l'infarctus/nécrose d'une ou des deux surrénales sont observées chez quatre et trois animaux survivants respectivement. Un rat présente aussi une nécrose étendue de la glande parotide. En plus des changements dégénératifs du myocarde, un rat survivant montre une inflammation légère à mononucléaires du muscle cardiaque dans les zones en dégénérescence du ventricule droit.

6.3.3 *In vitro*

Pelin *et al.* (2016c) ont comparé l'activité cytotoxique de l'OVTX-a purifiée par Ciminiello *et al.* (2012c) avec celle de la PLTX (extraite et purifiée du *Palythoa tuberculosa* et commercialisée par la société Wako) à l'aide du test hémolytique. Les résultats montrent que la PLTX est 10 fois plus active que l'OVTX-a. Si l'étude récente de Poli *et al.* (2018) a confirmé une différence de degré de toxicité entre la PLTX et l'OVTX-a (plus précisément un mélange d'OVTX contenant majoritairement de l'OVTX-a) dans le test hémolytique, celle-ci n'est que très faible (CE_{50} respectivement de 0,43 et 0,56 ng.mL^{-1}).

L'écart observé entre les 2 études pourrait être attribué à l'utilisation d'érythrocytes humains pour Pelin *et al.* (2016b) et de souris pour Poli *et al.* (2018). De plus, l'origine géographique des souches utilisées pour la purification de l'OVTX-a pourrait également avoir joué un rôle puisque Pelin *et al.* (2016b) ont utilisé l'OVTX-a purifiée à partir d'une souche méditerranéenne alors que Poli *et al.* (2018) ont utilisé une souche japonaise connue pour produire les isomères AC des OVTXs. Ces derniers possèdent une masse molaire identique mais un temps de rétention différent en chromatographie (Suzuki *et al.*, 2012).

De même Pelin *et al.* (2016b) ont comparé l'activité cytotoxique de l'OVTX-a et de la PLTX sur la lignée cellulaire de kératinocytes HaCaT. Ils rapportent que la PLTX est 100 fois plus cytotoxique que l'OVTX-a. Les résultats du projet ANR Ocean15 ne confirment pas cette conclusion : les OVTX-a et -d purifiées à partir d'une souche d'*Ostreopsis cf. ovata* isolée dans la rade de Villefranche-sur-Mer montrent une toxicité très similaire à celle de la PLTX après 24 h de traitement sur différentes lignées cellulaires, que ce soit les kératinocytes humains HaCaT ou les cellules pulmonaires A549 (1,61 ng.mL^{-1} pour OVTX-a et 1,399 ng.mL^{-1} pour

PLTX) (Fessard, comm. pers.). En revanche, des différences sont observées sur les cellules intestinales Caco-2 différenciées cultivées en inserts (Gémin *et al.*, 2022). Ainsi, la PLTX affecte l'intégrité de la monocouche cellulaire à la plus forte concentration testée ($0,5 \text{ ng.mL}^{-1}$) après 24h de traitement, avec un léger effet déjà visible après 4h de traitement. Cependant, l'OVTX-a induit un effet uniquement à 24 h et à une concentration 10 fois plus forte (5 ng.mL^{-1}) tandis que l'OVTX-d à 5 ng.mL^{-1} n'affecte pas l'intégrité de la monocouche.

6.3.4 Mécanisme d'action

Le GT n'a pas identifié d'étude relative au mécanisme d'action des OVTX.

6.4 Toxicité d'autres analogues de la PLTX

6.4.1 Toxicité de l'ostrocine-D

Cinétique

Le GT n'a pas identifié d'étude de cinétique *in vivo* ou *in vitro* sur l'OST-D. Cependant, compte tenu des effets observés au niveau du rein après administration sublinguale, l'OST-D peut être absorbée par ingestion (Ito et Yasumoto, 2009).

In vivo

Administration intratrachéale

L'OST-D montre une dose létale de $11 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ pc}$ par instillation intratrachéale (Ito et Yasumoto, 2009). Par cette voie, l'OST-D tue les souris en 1 h à $13 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ pc}$ et en 6 h à $11 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ pc}$. Les souris qui meurent dans l'heure présentent un saignement au niveau pulmonaire et stomacal. Avec des doses sublétales ($4,5 - 9 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ pc}$), les souris présentent une incoordination motrice après 2 heures. Des lésions pulmonaires hémorragiques induites par l'OST-D sont comparables à celles causées par la PLTX. Les deux toxines exercent une forte toxicité par cette voie d'administration. Cependant, les lésions causées par l'OST-D ont été observées sur une large gamme de doses, elles ont progressé et la récupération a été beaucoup plus lente que pour les lésions générées par la PLTX.

Ingestion

Par gavage, l'OST-D n'induit pas de mortalité des souris à une dose maximale de $300 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ pc}$ à 24h (Ito et Yasumoto, 2009). L'administration par gavage de $300 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$ d'OST-D ne provoque pas de changements histologiques à 24h. En revanche à $500 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ pc}$ des changements précoces sont observés dès 2h. Pour des doses autour de $200 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ p.c.}$, une légère accumulation de fluide gastrique ainsi qu'une érosion sous forme d'un ulcère rond sont observées dans l'estomac, qui s'accompagne de lésions au niveau de l'intestin grêle (érosion puis œdème avec le temps), des poumons (congestion et destruction des alvéoles) et des reins (atrophie des glomérules). La dose de $200 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ pc}$ est proposée comme LOAEL orale pour l'OST-D (Ito et Yasumoto, 2009).

En administration sublinguale à 200 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc, l'OST-D provoque des lésions dans différents organes après 24 heures. Les effets de l'OST-D (172-223 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc) sont comparables à ceux de la PLTX. Ils débutent 15 min après l'administration et sont visibles pendant 3 jours. Ils se manifestent par une congestion pulmonaire et une destruction légère des alvéoles ainsi qu'un ulcère circulaire au niveau de l'estomac (après 15 min). Une légère érosion est observée sur les 3 jours, au niveau de l'estomac et des intestins. Ces données indiquent que l'OST-D est susceptible de rejoindre la circulation sanguine depuis la bouche pour ensuite atteindre divers organes et produire des altérations morphologiques et fonctionnelles (Ito et Yasumoto, 2009).

Topique

Le GT n'a pas identifié d'étude de toxicité topique avec l'OST-D.

Oculaire

Le GT n'a pas identifié d'étude de toxicité oculaire avec l'OST-D.

Injection intrapéritonéale

En injection intrapéritonéale, l'OST-D tue une souris à une dose de 5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc contre 1,5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc pour la PLTX (Ito *et al.*, 1996; Ito et Yasumoto, 2009). L'OST-D a une DL_{50} de 0,75 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc chez la souris en ip (Usami *et al.*, 1995).

La souris ayant reçu une injection i.p. de 5, 6 ou 7 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc d'OST-D est morte en quelques heures avec une paralysie des membres (Ito et Yasumoto, 2009). On observe une congestion systémique comme avec la PLTX mais aussi une érosion au niveau stomacal et intestinal. À une dose sublétales (4 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pc), les souris présentent des troubles de la motricité pendant quelques heures et une légère diarrhée autour de 10 h avant de récupérer à 24 h. Les altérations de type péritonite observées avec la PLTX ne sont pas retrouvées avec l'OST-D (Ito et Yasumoto, 2009).

In vitro

L'OST-D a une CI_{50} de 2,5 pM sur les cellules P388 et induit une hémolyse à 50% pour 39,5 nM (Usami *et al.*, 1995). Sur des cellules HaCaT (kératinocytes), l'OST-D (extraite et purifiée à partir d'*O. cf. siamensis* par le Laboratoire Japonais de Recherche sur l'Alimentation) s'est révélée 1000 fois moins cytotoxique que la PLTX (Pelin *et al.*, 2016b).

Des cellules de neuroblastome BE(2)-M17 traitées avec 75 nM d'OST-D pendant 4h apparaissent rétractées avec une fluorescence faible et diffuse de l'actine F dans leur cytoplasme et des intensités plus fortes dans la région nucléaire, de manière similaire à ce qui est observé avec la PLTX (Ares *et al.*, 2009). L'OST-D a en effet induit un réarrangement de l'actine monomérique vers le noyau. La toxine a également provoqué une diminution de la viabilité cellulaire des neuroblastomes BE(2)-M17, sensible à l'ouabaïne. Ces résultats suggèrent que l'OST-D comme la PLTX déstabilise le cytosquelette d'actine.

Mécanisme d'action

L'OST-D, comme la PLTX, crée une dépolarisation des cellules, induisant une entrée d'ions Ca^{2+} dans le cytosol (Louzao *et al.*, 2007) ce qui agit ensuite sur le cytosquelette des cellules

par réduction de la quantité d'actine (Ares *et al.*, 2005; Louzao *et al.*, 2007). Cependant, le mécanisme d'action n'a pas été investigué.

6.4.2 Toxicité des mascarénotoxines

Cinétique

Le GT n'a pas identifié d'étude de cinétique pour les McTX.

In vivo

Inhalation /instillation intranasale

Le GT n'a pas identifié d'étude de toxicité par inhalation/instillation intranasale ou intratrachéale avec des McTX.

Ingestion

Le GT n'a pas identifié d'étude de toxicité par ingestion avec des McTX.

Topique

Le GT n'a pas identifié d'étude de toxicité topique avec des McTX.

Oculaire

Le GT n'a pas identifié d'étude de toxicité oculaire avec des McTX.

Injection intrapéritonéale

L'extrait brut méthanolique et la fraction n-butanol générés à partir d'une culture d'*O. mascarenensis* isolée de Rodrigues (océan Indien) provoquent les mêmes symptômes chez les souris : prostration, paralysie progressive des membres postérieurs, dyspnée, et mort après convulsions 20 min après l'injection i.p. (Lenoir *et al.*, 2004). L'extrait brut montre une DL₅₀ de 0,9 mg.kg⁻¹ pc. Avec la fraction butanol, aucune diarrhée n'est observée.

In vitro

Les mascarénotoxines (MCTX) A et B possèdent une activité hémolytique moins importante que celle de la PLTX purifiée de *Palythoa toxica* (Lenoir *et al.*, 2004). Cependant, elle est plus élevée pour la MCTX-B que pour la MCTX-A : 0,4 mg.ml⁻¹ de MCTX-A et 0,1 mg.mL⁻¹ de MCTX-B correspondent respectivement à 0,8 et 0,2 mg .mL⁻¹ d'eq PLTX. Même si les structures des mascarénotoxines n'ont pas encore été déterminées, les auteurs ont supposé que cette différence / variabilité de toxicité tirerait son origine des différences structurales observées entre les MCTX et la PLTX, comme supposé par Pelin *et al.* (2016b) pour expliquer la différence de toxicité entre PLTX et OST-D 2.

Mécanisme d'action

Le GT n'a pas identifié d'étude relative au mécanisme d'action des McTX.

6.5 Toxicité des autres « toxines » produites par *Ostreopsis*

6.5.1 Toxicité des ostréols

Cinétique

Le GT n'a pas identifié d'étude de cinétique *in vivo* ou *in vitro* sur les ostréols.

In vivo

Inhalation /instillation intranasale

Le GT n'a pas identifié d'étude de toxicité par inhalation/instillation intranasale ou intratrachéale avec des ostréols.

Ingestion

Le GT n'a pas identifié d'étude de toxicité orale avec des ostréols.

Topique

Le GT n'a pas identifié d'étude de toxicité topique avec des ostréols.

Oculaire

Le GT n'a pas identifié d'étude de toxicité oculaire avec des ostréols.

Injection intrapéritonéale

In vitro

L'ostréol-B montre une légère activité cytotoxique pour différentes lignées cellulaires (hépatocarcinome HepG2, neuroblastome Neuro2A et cellules cancéreuses de côlon HCT-116) avec une CE₅₀ comprise entre 0,1 et 4,8 µM (Hwang *et al.*, 2018).

Pour des kératinocytes (HaCaT), Pelin *et al.* (2016b) ont obtenu une CE₅₀ de 0,018 nM. D'après la thèse de Marin-Pierre Gemin (Université de Nantes, 2020), Kim *et al.* (2017) présentaient dans un poster de la conférence DINO11 à Bordeaux, la structure de l'ostréol-C (C₆₄H₁₁₆O₂₃) avec une activité cytotoxique modérée sur HepG2, Neuro-2a and HCT-116, comprise entre celle de l'ostréol-A (i.e. le plus toxique) et -B.

Mécanisme d'action

Le GT n'a pas identifié d'étude visant à caractériser le mode d'action des ostréols.

6.5.2 Toxicité des ostréotoxines

Cinétique

Le GT n'a pas identifié d'étude de cinétique *in vivo* ou *in vitro* sur les OTX.

In vivo

Inhalation /instillation intranasale

Le GT n'a pas identifié d'étude de toxicité par inhalation/instillation intranasale ou intrachéale avec des OTX.

Ingestion

Le GT n'a pas identifié d'étude de toxicité orale avec des OTX.

Topique

Le GT n'a pas identifié d'étude de toxicité topique avec des OTX.

Oculaire

Le GT n'a pas identifié d'étude de toxicité oculaire avec des OTX.

Injection intrapéritonéale

Peu de données sont disponibles sur les effets des ostréotoxines (OTX), cependant ces dernières ont montré des activités neurotoxiques par injection i.p. à des souris (DL₅₀ de 32 mg.kg⁻¹ pc) (Mercado *et al.*, 1994b).

La présence d'OTX-3 dans des extraits méthanoliques de *O. lenticularis* est associée à une augmentation significative de la toxicité chez la souris (Tosteson dans Meunier *et al.*, 1997).

In vitro

Le GT n'a pas identifié d'étude sur la toxicité cellulaire des OTX.

Mécanisme d'action

L'OTX-1 purifiée à partir d'extraits méthanoliques d'*O. lenticularis* en culture agit sur les cholinoccepteurs nicotiques (Escalona de Motta *et al.*, 1992).

L'OTX-3 (1-10 µg.mL⁻¹) induit une dépolarisation des fibres musculaires squelettiques de grenouille associée à des contractions spontanées. Cette dépolarisation membranaire induite par l'OTX-3 est inhibée par la TTX (10 µM) mais pas par la d-tubocurarine. OTX-3 est susceptible d'activer les canaux sodium musculaires (Meunier *et al.*, 1997).

6.5.3 Toxicité des liguriatoxines et des riviératoxines

Ces toxines ont été identifiées récemment (Ternon *et al.*, 2022b), leur toxicité est encore méconnue, seules des données de cytotoxicité *in vitro* ont été publiées. Elles indiquent que ces composés ont une toxicité plus faible que la PLTX sur des cellules humaines pulmonaires NCI-H460 avec des CE50 de 680 à 3120 ng.mL⁻¹ comparé à la PLTX (0,0446ng.mL⁻¹).

6.6 Valeur toxicologique de référence

Considérant l'insuffisance des données d'intoxications humaines et animales (Wiles *et al.*, 1974 ; Fujiki *et al.*, 1986, Poli *et al.*, 2018), **aucune VTR pour une exposition court terme par inhalation ou contact cutané à la PLTX n'a pu être proposée.**

Les symptômes observés à la suite d'une exposition aiguë à la PLTX par voie orale chez la souris sont une piloérection, une léthargie, une ataxie, des douleurs abdominales et une dyspnée. **Une VTR aiguë par voie orale de 0,08 µg PLTX.kg⁻¹ pc** a été élaborée par le CES VSR, sur la base d'un NOAEL³² dérivé à partir de l'étude de Boente-Juncal *et al.* (2020a). **Cette valeur est associée à un indice de confiance³³ moyen-faible (Anses, 2023).**

L'exposition orale humaine de manière répétée à la PLTX est susceptible de se produire par la consommation de produits de la mer contaminés ou l'ingestion d'eau contaminée lors de la baignade ou de la pratique d'activités nautiques, notamment pour des populations vivant dans les zones côtières. Les symptômes observés après exposition orale répétée pendant 28 jours à la PLTX chez la souris sont une léthargie, une ataxie, des douleurs abdominales et une dyspnée. **Une valeur toxicologique indicative (VTI)³⁴ pour une exposition moyen terme par voie orale de 0,2 ng PLTX. kg⁻¹ pc/j** a été élaborée par le CES VSR, sur la base d'un NOAEL dérivé à partir de l'étude de Boente-Juncal *et al.* (2020b) (Anses, 2023).

Les données concernant les autres toxines connues sont très parcellaires avec majoritairement des études *in vitro*.

Pour ces raisons, **il n'a pas été possible d'établir de VTR pour toutes ces autres toxines.**

Du fait de la similarité des effets induits par la PLTX, les OVTX ou l'OST-D chez l'animal, le GT « *Ostreopsis* » estime que la VTR aiguë élaborée pour l'exposition par voie orale à la PLTX s'applique à la somme non pondérée des doses d'exposition (sous l'hypothèse d'une équivalence toxique) rapportée au poids corporel.

³² Le NOAEL (non observed adverse effect level) ou dose sans effet nocif observable, est la dose la plus élevée d'une substance chimique ne produisant aucun effet nocif observable au cours d'une étude de toxicité.

³³ L'Anses attribue un niveau de confiance global à chaque VTR en prenant en compte la nature et la qualité des données, l'effet critique et son mode d'action, le choix de l'étude clé, le choix de la dose critique. Pour chaque critère, un niveau de confiance doit être fixé et en combinant les niveaux de chaque critère, un niveau de confiance global est déterminé par avis d'experts. Cinq niveaux de confiance sont possibles : **fort, moyen-fort, moyen, moyen-faible ou faible**.

³⁴ Une VTI est un repère toxicologique pouvant être utilisé pour évaluer les risques sanitaires d'une substance en l'absence de VTR. Il s'agit d'une valeur indicative moins robuste que la VTR présentant ainsi un niveau de confiance faible. Comme les VTR, elles sont spécifiques d'une substance, d'une voie et d'une durée d'exposition (Anses, 2017).

6.7 Points à retenir

- La majorité des données de toxicité disponibles, *in vivo* et *in vitro*, ont été obtenues avec la PLTX. La toxicité de la PLTX a été étudiée, sur de nombreux modèles animaux et par différentes voies d'exposition notamment par ingestion. Les études disponibles se sont le plus souvent penchées sur la toxicité court terme, et quelques études apportent des données sur la toxicité moyen terme.
- Peu – voire très peu – de données de toxicité sont disponibles pour toutes les autres toxines produites par *Ostreopsis*, notamment en raison de leur manque de disponibilité commerciale et de la difficulté de purification ou de synthèse chimique.
- La PLTX agit sur le système nerveux périphérique, les marqueurs circulants de dommages cellulaires, le système cardiovasculaire et les viscères.
- La PLTX se fixe à la pompe Na⁺/K⁺-ATPase qu'elle convertit en un canal ionique cationique. Cette pompe étant exprimée de manière ubiquitaire, la PLTX exerce ses effets délétères à de plusieurs niveaux. *In vitro*, le test d'hémolyse est souvent utilisé pour caractériser sa présence ou celle des toxines du groupe de la PLTX.
- Les données toxicocinétiques de la PLTX, et des autres toxines produites par *Ostreopsis*, sont parcellaires et doivent faire l'objet d'investigation de recherche.
- Au vu des données disponibles, les doses induisant la mortalité et les symptômes et lésions observés apparaissent très similaires entre la PLTX et l'OVTX-a. L'ensemble des résultats obtenus par des études *in vivo* et *in vitro* suggère que les mécanismes cellulaires d'action de la PLTX et de l'OVTX-a sont très proches.
- Seules des données de toxicité aiguë sont disponibles pour l'OST-D par diverses voies d'administration. Les effets rapportés sont néanmoins assez similaires à ceux de la PLTX.
- Une VTR aiguë et une VTI moyen terme par voie orale ont été proposées pour la PLTX. Du fait de la similarité des effets induits par la PLTX, les OVTX ou l'OST-D chez l'animal, la PLTX peut être utilisée comme un proxi, c'est-à-dire un équivalent toxicologique. La VTR aiguë élaborée pour l'exposition par voie orale à la PLTX s'applique à la somme non pondérée des doses d'exposition (sous l'hypothèse d'une équivalence toxique) rapportée au poids corporel.

7 Contamination du milieu par *Ostreopsis* et ses toxines

Ce chapitre présente l'état des connaissances relatives aux données de contamination de l'eau, des aérosols et des produits de la mer en lien avec des épisodes de prolifération d'*Ostreopsis* spp.

7.1 Eau

7.1.1 Abondances des espèces du genre *Ostreopsis*

L'impact d'*Ostreopsis* spp. sur les organismes marins et sur la santé humaine est lié à l'abondance des cellules dans les différents compartiments (fond, colonne d'eau et surface). La mesure de cette abondance est difficile car de nombreux paramètres influencent la répartition des cellules des microalgues dans le temps et dans l'espace, même à petite échelle. Pendant leur phase benthique, l'abondance des cellules d'*Ostreopsis* spp. dépend du type de substrat sur lequel elles se développent, de la profondeur, de la période de la journée et de l'hydrodynamisme du site. Lorsque ces microalgues sont dans la colonne d'eau ou en surface, la répartition est également très hétérogène, notamment parce que les cellules se distribuent sous forme d'agrégats (les cellules produisent du mucus et s'agrègent souvent entre elles). Il existe également dans ces deux compartiments (colonne d'eau et surface), une forte variabilité de l'abondance des cellules en fonction de l'heure de prélèvement. Enfin la surface des fonds côtiers colonisés par *Ostreopsis* n'est généralement pas estimée. Pour toutes ces raisons, il est très difficile de comparer les abondances des espèces du genre *Ostreopsis* dans différentes zones mais il existe cependant de grandes tendances qui sont présentées ci-après.

7.1.1.1 En zones tropicales

Dans les Antilles françaises, les abondances d'*Ostreopsis* spp. sont le plus souvent de quelques centaines de cellules par gramme de poids frais de macroalgues (cell.g PF⁻¹), et beaucoup plus rarement de dizaines de milliers de cellules (moyenne en Guadeloupe : 2 403 cell.g PF⁻¹; moyenne en Martinique : 260 cell.g PF⁻¹ (Boisnoir *et al.*, 2019) ; maximum à Saint Martin : 15 000 cell.g PF⁻¹ (Boisnoir *et al.*, 2020)). Ces valeurs sont comparables à celles d'autres études réalisées dans le bassin caribéen (Ballantine, Bardales et Tosteson, 1985; Ballantine, Tosteson et Bardales, 1988; Delgado *et al.*, 2006; Irola-Sansores *et al.*, 2018; Okolodkov *et al.*, 2014) où il n'est jamais signalé la présence de biofilms épais. De même, Nascimento *et al.* (2012) ont toujours mesuré des abondances inférieures à 100 000 cell.g PF⁻¹ d'*O. cf. ovata* dans une île tropicale atlantique (Rocher de Saint Paul).

Au Brésil, à environ 25° de latitude Sud (Currais), Tibiriçá *et al.* (2019) ont observé une prolifération d'*O. cf. ovata* avec un maximum d'abondance de 560 000 cell.g PF⁻¹.

7.1.1.2 En zones tempérées

En Nouvelle-Zélande, les proliférations d'*O. siamensis* peuvent atteindre 1,4 millions cell.g¹ PF⁻¹ (Shears et Ross, 2009).

Dans leurs études en Méditerranée nord-occidentale, Mangialajo *et al.* (2011) ont recensé les abondances maximales d'*O. cf. ovata* dans les compartiments benthiques et planctoniques observées en Espagne, en France, à Monaco et en Italie, entre 2007 et 2009. Dans le compartiment benthique, les concentrations maximales ont été observées en Espagne, avec plus de 7 10⁶ cell.g PF⁻¹. En France, à Monaco et en Italie, les maximums étaient proches de 1,7 10⁶ cell.g PF⁻¹. Dans le compartiment planctonique, les concentrations maximales dans l'eau mesurées en Espagne étaient de 385 000 cell.L⁻¹, en France de 116 000 cell.L⁻¹, à Monaco de 21 000 cell.L⁻¹ et en Italie de 92 500 cell.L⁻¹. Enfin, concernant le littoral atlantique français, durant l'été 2018, Drouet *et al.* (2021) ont toujours mesuré moins de 100 000 cellules d'*O. cf. siamensis* cell.g PF⁻¹ de macroalgues.

Des mesures d'abondances d'*Ostreopsis* en zones benthiques ont été réalisées par l'Ifremer entre 2007 et 2009 au niveau de cinq sites en Méditerranée, en Rade de Toulon (anse Méjan, Oursinières) et en rade de Marseille (Bain des Dames, Emdoume plage et Morgiret). L'abondance maximale a été observée en juillet 2009 au Morgiret avec presque 400 000 cell.g PF⁻¹ de macroalgues.

L'analyse des publications en relation avec les abondances d'*Ostreopsis* spp. semble montrer que les abondances maximales d'*Ostreopsis* spp. sont considérablement plus élevées dans les zones tempérées (où elles peuvent atteindre des millions de cell.g PF⁻¹) que dans les zones tropicales où leur nombre est le plus souvent largement inférieur à 100 000 cell.g PF⁻¹.

7.1.1.3 Abondance des cellules d'*Ostreopsis* sur la côte méditerranéenne française

Tichadou *et al.* (2010) ont recensé, entre 2006 et 2009, la fermeture de cinq plages en région Provence-Alpes-Côte d'Azur, en raison du dépassement du seuil réglementaire de pré-alerte de 30 000 cell.L⁻¹ dans le compartiment planctonique (seul compartiment avec des seuils réglementaires à cette époque). Cependant, les auteurs ne précisent pas les valeurs exactes des abondances cellulaires.

À Villefranche-sur-Mer (Alpes-maritimes), des analyses d'eau effectuées en fond de baie ont entraîné la fermeture de la « Plage des jeunes » fin juillet 2008 (36 400 cellules.L⁻¹) et fin juillet 2009 (184 000 cellules.L⁻¹) (R. Lemée, comm. pers.).

Depuis 2009, un suivi est réalisé dans une zone plus proche de l'entrée de la rade de Villefranche-sur-Mer (Rochambeau) à la fois sur des échantillons d'eau et de macrophytes. Cette zone a été interdite au public fin juillet 2011 (deux sites analysés, avec respectivement 48 200 cell. L⁻¹ associées à 5 856 200 cell.g PF⁻¹ puis 34 080 cell.L⁻¹ associées à 2 212 248 cell.g PF⁻¹) (R. Lemée, comm. pers.).

Un suivi a été réalisé chaque été depuis 2007 à la plage du Larvotto à Monaco (Drouet *et al.*, 2022). L'abondance moyenne d'*Ostreopsis* benthique, de 2007 à 2019, est de 570 878 cell. g PF⁻¹, avec un maximum de 1 565 514 cell. g PF⁻¹ durant l'été 2007 et un minimum de 212 300 cell. g PF⁻¹ en 2011. Même en période de fortes abondances dans le compartiment benthique, les abondances dans le compartiment planctonique n'ont jamais dépassé le seuil sanitaire de pré-alerte de 30 000 cell. L⁻¹ (R. Lemée, comm. pers.).

L'analyse des données du contrôle sanitaire des eaux de baignade du bassin méditerranéen français (départements des Bouches-du-Rhône, du Var et des Alpes-Maritimes), recueillies entre 2018 et 2021, montre que :

- à l'exception des quelques épisodes de fortes concentrations décrits ci-dessus et de quelques valeurs ponctuellement élevées, les concentrations cellulaires en *Ostreopsis* sont majoritairement inférieures à 1 000 cell. L⁻¹ dans l'eau ;
- l'année 2018 est celle où les plus fortes concentrations cellulaires d' *Ostreopsis cf ovata* dans le compartiment planctonique ont été observées, la valeur maximale mesurée étant de 80 000 cell.L⁻¹ à la fin du mois de juillet à Fréjus (Figure 31);
- des concentrations cellulaires planctoniques dépassant 10 000 cell.L⁻¹ ont été mesurées dans la calanque des Louvans à Fréjus du 23 juillet au 6 août 2018 et sur la plage Méjean à Toulon entre le 11 juillet et 1 août 2018. La calanque des Louvans a connu un autre épisode de prolifération du 28 juillet au 13 août 2020 où des concentrations comprises entre 8 000 et 77 000 cell.L⁻¹ ont été observées à trois dates consécutives ;
- sur la base des données disponibles, les concentrations cellulaires planctoniques d'*O. cf. ovata* semblent plus élevées dans le département du Var que dans les deux autres départements ayant fait l'objet d'un suivi.

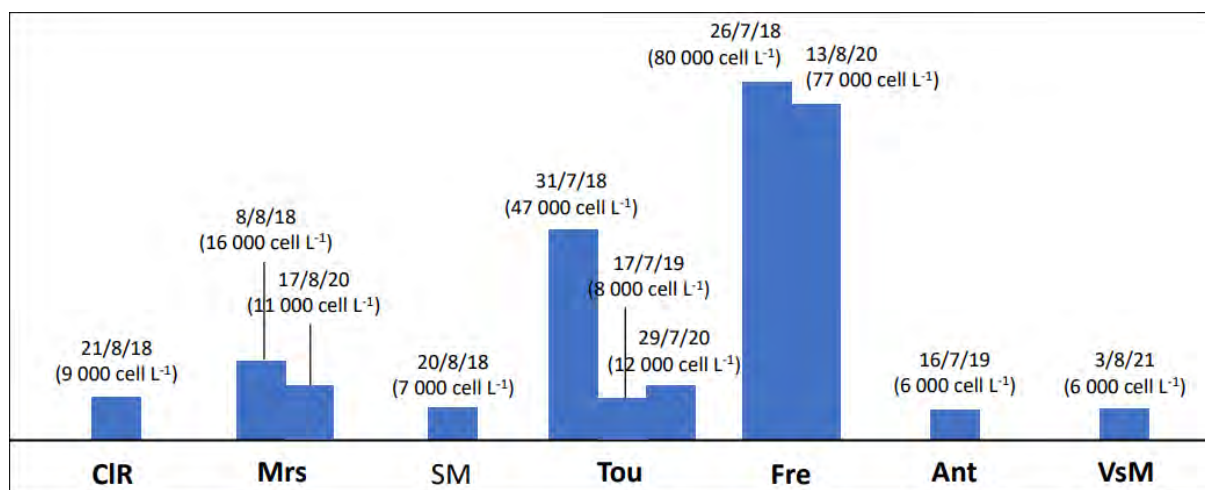


Figure 31 : Abondances (cellules L⁻¹) maximales d'*Ostreopsis* observées aux divers sites suivis dans le cadre du contrôle sanitaire des eaux de baignade ARS entre 2018 et 2021

Seules les concentrations > 5 000 cellules/L ont été sélectionnées pour cette figure. Les communes ayant fait l'objet d'une surveillance sont d'Ouest en Est : Carry-le-Rouet (CIR), Marseille (Mrs), Saint-Mandrier-sur-Mer (SM)*, Toulon (Tou), Fréjus (Fré), Antibes (Ant), Villefranche-sur-Mer (VsM).

*Le site de Saint-Mandrier-sur-Mer n'a fait l'objet d'un suivi qu'en 2018. D'autres sites avaient également fait l'objet d'un unique suivi en 2018 (Port-de-Bouc, Martigues, Sausset-les-Pins, Cassis, La Ciotat, La Croix-Valmer, Théoule-sur-Mer, Cannes) sans que les valeurs d'abondance ne dépassent 5 000 cellules/L, ils ne figurent donc pas sur le graphique.

7.1.1.4 Abondance des cellules d'*Ostreopsis* sur la côte basque en 2022

Les données relatives à *Ostreopsis* (mélange de deux espèces, d'*O. cf. ovata* et *O. cf. siamensis*, Chomérat *et al.*, 2022) collectées par l'Ifremer en 2022 sur la côte basque, concernent à la fois des prélèvements effectués dans l'eau et sur des macrophytes.

Les échantillons d'eau ont été collectés très majoritairement en matinée entre janvier et octobre 2022 sur quatre plages des communes de Biarritz, Bidart, Saint-Jean-de-Luz et Hendaye (Figure 32). Une première analyse réalisée par les experts du GT « *Ostreopsis* », montre que :

- les valeurs les plus élevées d'abondance cellulaires sont enregistrées pendant les mois de juillet et d'août sur les quatre sites d'étude, la valeur la plus élevée de 173 500 cell.L⁻¹ ayant été estimée sur un échantillon prélevé sur la plage de la Villa Belza à Biarritz le 11 août 2022 ;
- sur trois des sites surveillés (Bidart, Saint-Jean-de-Luz et Hendaye), la croissance est très rapide lors des deux dernières semaines de juin avec des abondances passant de 0-250 cell.L⁻¹ à 15 000 - 60 000 cell.L⁻¹. Sur le site de Biarritz, l'augmentation semble plus progressive entre la mi-juin et la mi-juillet ;
- sur tous les sites, une forte diminution des abondances cellulaires, passant de 13 150-55 900 cell.L⁻¹ à 350-9 700 cell.L⁻¹, est observée lors des 15 premiers jours de septembre.

Comme attendu, on peut constater que les concentrations cellulaires les plus fortes ont été observées sur chaque site pendant la période où la température de l'eau était la plus élevée.

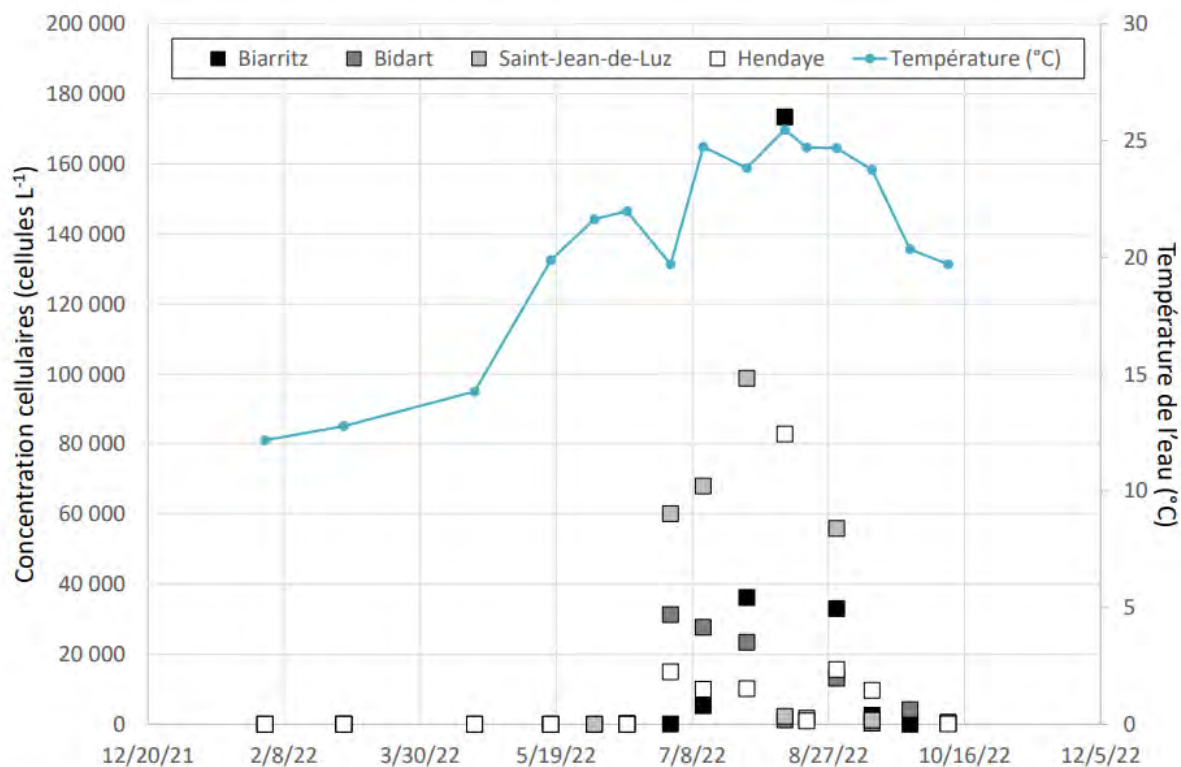


Figure 32 : Évolution de l'abondance d'*Ostreopsis* (carrés blancs, gris et noirs) dans la colonne d'eau (en cellules/L) et des températures de l'eau (courbe bleue) aux quatre points surveillés en 2022 par l'Ifremer sur la côte basque

Pour les prélèvements réalisés sur les macrophytes, il apparaît (Figure 33) que :

- les abondances cellulaires benthiques maximales sont observées en été, avec plus de huit millions de cell. g PF⁻¹ recensées à la surface de la macroalgue *Gelidium corneum* (échantillon prélevé fin juin 2022 à Saint-Jean-de-Luz) ;
- les abondances cellulaires benthiques connaissent une forte augmentation pendant la première quinzaine de juin, alors que l'augmentation des abondances cellulaires planctoniques survient lors de la deuxième quinzaine de ce même mois.

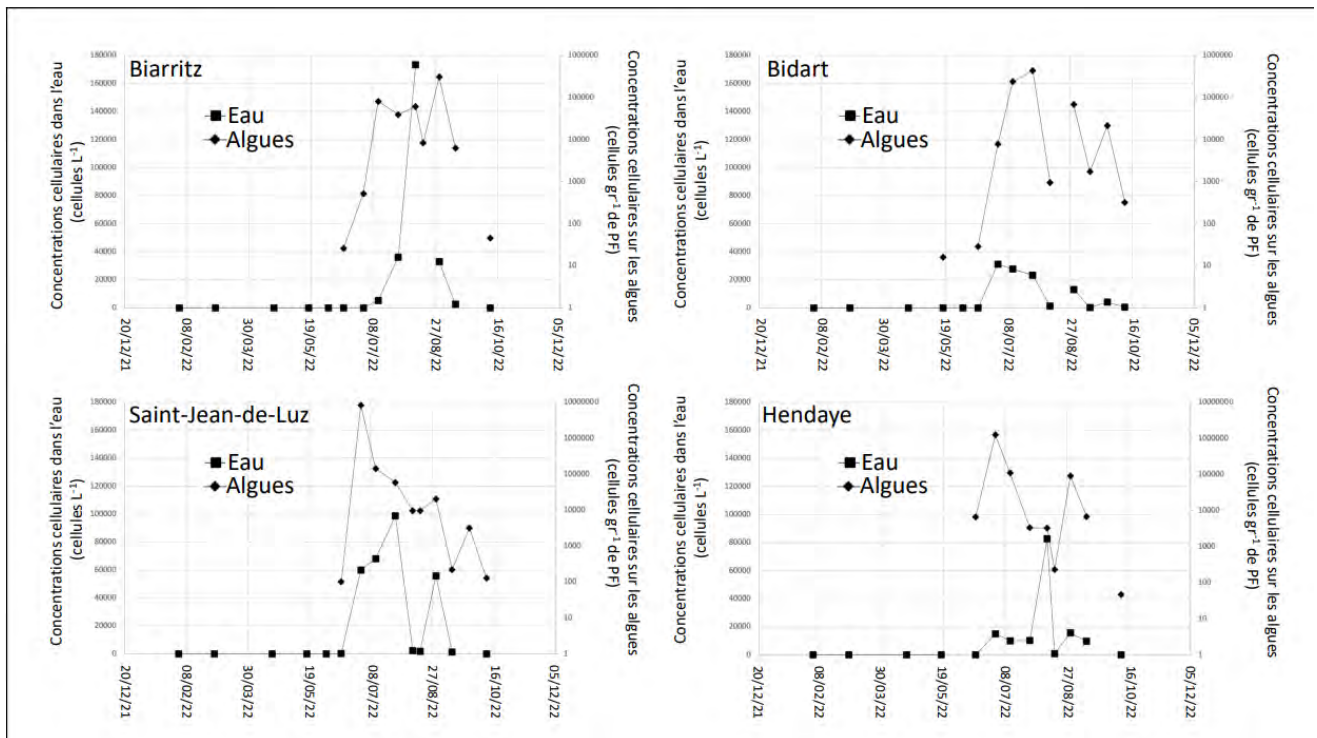


Figure 33 : Variations des abondances cellulaires d'*Ostreopsis* (mélange de deux espèces, *O. cf. ovata* et *O. cf. siamensis*) pendant sa phase benthique (losanges noirs, concentrations exprimées en nombre de cellules par gramme de poids frais de la macroalgue (cell.g PF⁻¹) sur laquelle était réalisé le prélèvement) et pendant sa phase planctonique (carrés noirs, concentrations exprimées en nombres de cellules/L d'eau ; ces valeurs sont déjà présentées dans la figure 32) sur les quatre sites suivis par l'Ifremer en 2022.

L'axe des concentrations cellulaires benthiques est exprimé en échelle logarithmique (Log10).

Des prélèvements effectués en sub-surface, sous les fleurs d'eau, contenait jusqu'à 12 millions de cellules d'*Ostreopsis*/L. (audition Mme ANTAJAN, sept 2022).

7.1.2 Toxines

Les données bibliographiques disponibles relatives à la contamination du milieu aquatique par les toxines produites par *Ostreopsis spp.* ne portent que sur les concentrations d'OVTX.

Les OVTX sont des toxines majoritairement intracellulaires. Des suivis sur des cultures d'*Ostreopsis* ont montré qu'une partie des OVTX produites est présente également dans la fraction extracellulaire dans l'eau (toxine dissoute ou adsorbée au mucus) (Pezzolesi *et al.*, 2012 ; Ternon *et al.*, 2018 ; Ternon *et al.*, 2022a, Giussani *et al.*, 2015). Cette distribution en deux fractions (intracellulaire et extracellulaire) des OVTX est importante car elle peut avoir une répercussion sur la biodisponibilité des toxines et donc sur les niveaux d'exposition de la population. À ce jour, une seule étude a recherché *in situ* la présence concomitante d'OVTX extracellulaires (toxines dissoutes ou adsorbées au mucus) et intracellulaires, dans l'eau de mer (Ciminiello *et al.*, 2006) alors que toutes les autres études n'ont estimé que les concentrations intracellulaires (Accoroni *et al.*, 2011 ; Pfannkuchen *et al.*, 2012 ; Brissard *et al.*, 2014 ; Carnicer *et al.*, 2015 ; Gémin *et al.*, 2019, 2020 ; Tibiriça *et al.*, 2019 ; Gu *et al.*, 2022).

La très grande majorité des données de concentrations en toxines intracellulaires provient de quantifications d'OVTX dans des cultures d'*Ostreopsis cf. ovata* et seul un faible nombre d'études présente des données de concentrations en milieu naturel.

Fraction intracellulaire

La concentration en OVTX par cellule est variable en fonction de l'origine géographique des échantillons (Tartaglione *et al.*, 2017) et de la nature du substrat sur lequel se sont développées les cellules d'*Ostreopsis* (Gémin *et al.*, 2020). En culture, il a été montré que la production des OVTX dépend de la phase de croissance des cellules considérée (Brissard *et al.*, 2015 ; Ternon *et al.*, 2022a) ; elle est maximale en fin de phase exponentielle de croissance (Ternon *et al.*, 2022a) ou, à la suite de la phase exponentielle, lorsque la division cellulaire a cessé (Brissard *et al.*, 2015, Médina-Pérez *et al.*, 2021).

Les échantillons utilisés pour mesurer les concentrations en OVTX intracellulaires en milieu naturel sont majoritairement issus de prélèvements d'*Ostreopsis* dans le compartiment benthique sur des macrophytes. À partir des données disponibles, il apparaît que les concentrations intracellulaires en OVTX produites par *Ostreopsis cf. ovata* sont comprises entre la limite de détection (LD, non renseignée) et 75 pg cell⁻¹, avec une grande variabilité en fonction de l'origine géographique. En Mer de Chine du Sud, seules les OVTX-j et -k sont détectées à des concentrations de l'ordre de 1,57 à 4,83 pg cell⁻¹ (Gu *et al.*, 2022). Dans l'Océan Atlantique, au Brésil, une concentration moyenne de 35 pg cell⁻¹ d'OVTX-a été mesurée (Tibiriça *et al.*, 2019), tandis que des concentrations allant de 4,1 à 9,1 10⁻³ pg cell⁻¹ dans le compartiment benthique et de la LD à 60,4 10⁻³ pg cell⁻¹ dans le compartiment planctonique ont été mesurées dans des échantillons collectés sur la côte Atlantique au Maroc (Alkhatib *et al.*, 2022). Sur la côte atlantique française, les concentrations en OVTX ont été mesurées dans le compartiment planctonique uniquement et sont de l'ordre de 7,8 x 10⁻³ pg cell⁻¹ (Chomérat *et al.*, 2022). Les mesures ont été réalisées sur un mélange d'*O. cf. ovata* et *O. cf. siamensis*, ce qui conduit à une sous-estimation de la production toxinique puisque *O. cf. siamensis* ne produit pas d'OVTX. Aucune donnée de concentration en OVTX intracellulaire dans le compartiment benthique n'est disponible à ce jour pour la côte atlantique européenne.

Une forte variabilité des concentrations en OVTX intracellulaires dans le compartiment benthique existe entre les régions méditerranéennes, mais également au sein d'une même région. Ainsi, en Mer Adriatique, les concentrations intracellulaires varient entre 6,3 et 40,9 pg cell⁻¹ sur les côtes croates (Gladan *et al.*, 2019 ; Pfannkuchen *et al.*, 2012) et entre la LD (non renseignée) et 75 pg cell⁻¹ sur les côtes italiennes (Accoroni *et al.*, 2017 ; 2011). Par ailleurs, pour les côtes françaises et espagnoles, les fourchettes de concentrations varient respectivement entre 9 et 35 pg cell⁻¹ (Brissard *et al.*, 2014 ; Gémin *et al.*, 2020) et <1 à 25 pg cell⁻¹ (Carnicer *et al.*, 2015). Cette variabilité des concentrations intracellulaires a été confirmée par une expérience en laboratoire réalisée sur des souches d'*Ostreopsis cf. ovata* isolées de nombreuses régions méditerranéennes (Tartaglione *et al.*, 2017).

Fraction « extracellulaire »

En culture, il a été montré que les toxines peuvent être libérées tout au long de la croissance des cellules (Ternon *et al.*, 2022a) ou sécrétées activement par les cellules, notamment en présence de compétiteurs (Ternon *et al.*, 2018). La lyse cellulaire provoque la libération de tous les métabolites contenus dans la cellule, y compris les toxines. C'est pourquoi, les

concentrations maximales en toxines dissoutes sont mesurées en phase stationnaire de croissance (Vanucci *et al.*, 2012 ; Guerrini *et al.*, 2010 ; Ternon *et al.*, 2022a). Les OVTX sont hydrosolubles, entraînant leur dispersion rapide dans la colonne d'eau. Par ailleurs, leur faible stabilité dans la matrice eau de mer sous l'action de la lumière du soleil et de l'activité bactérienne fait que leur temps de demi-vie dans la colonne d'eau est inférieur à 10 heures (Ternon *et al.*, 2022c). Pour cette raison, mais aussi parce que la dilution des toxines dans la colonne d'eau est importante, la détection des OVTX dans ce compartiment est complexe en milieu naturel. L'unique donnée d'OVTX dissoute disponible n'est d'ailleurs pas exploitable car elle est exprimée en termes de quantité par échantillon, sans précision du volume d'eau (1,95 µg/échantillon ; Ciminiello *et al.*, 2006). Par ailleurs, le mucus produit par *Ostreopsis* aurait tendance à piéger et concentrer les toxines extracellulaires (Ternon *et al.*, 2022a). Ces dernières adhéreraient aux filaments de polysaccharides qui constituent un élément essentiel du mucus (Giussani *et al.*, 2015).

7.2 Aérosols

Plusieurs études ont mis en évidence un lien entre le signalement d'irritations des voies respiratoires et un épisode de prolifération d'*Ostreopsis* (Gallitelli, 2005 ; Brescianini, 2006 ; Illoul, 2011 ; Armengaud *et al.*, 2011 ; Berdalet 2022 ; Tichadou *et al.*, 2010 ; Tubaro *et al.*, 2011a ; Chomérat *et al.*, 2022 ; Paradis *et al.*, 2022) mais jusqu'à présent la détection simultanée de cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* dans la colonne d'eau et de ses toxines dans les aérosols n'a été renseignée que dans une seule étude (Ciminiello *et al.*, 2014). Ces auteurs mettent en évidence une concentration de 2,4 pg. L⁻¹ d'air d'OVTX-a lors d'une prolifération de 11 000 - 14 000 cell.L⁻¹ (dans le compartiment planctonique) et 12 000 - 30 000 cellules.g⁻¹ d'algues (dans le compartiment benthique) sur les côtes italiennes. Cette détection d'OVTX-a dans les aérosols ne s'est pas accompagnée de signalements/déclarations de symptômes dans la population côtière. Par ailleurs, la mesure d'abondances cellulaires similaires dans l'eau, à des dates différentes, n'a pas conduit à la détection d'OVTX-a dans les aérosols (LQ = 6,25 ng.mL⁻¹). Pourtant, le système de collecte d'aérosols était placé dans des conditions qui semblaient optimales. Mais les auteurs de cette étude suggèrent que c'est l'absence de vent en direction de la côte qui n'a pas permis le transport d'aérosols contenant des toxines, depuis l'eau jusqu'à la côte. De nombreuses incertitudes subsistent sur les flux et les mécanismes de transfert des toxines vers l'atmosphère

Conditions biotiques et abiotiques contrôlant l'aérosolisation des OVTX

L'aérosolisation des OVTX durant les phases exponentielles et stationnaires d'une prolifération naturelle d'*Ostreopsis cf. ovata* a été testée en conditions de laboratoire, en milieu contrôlé (Médina-Pérez *et al.*, 2021). Un volume de 50 L d'eau de mer a été incubé pendant 0,75 à 21 heures dans un générateur d'aérosols marins en système clos, avec une collecte simultanée des aérosols générés. Aucune donnée de la distribution de taille des aérosols n'est fournie dans l'étude. Cependant, une abondance cellulaire comprise entre 72 000 et 182 000 cell.L⁻¹ en phase exponentielle de prolifération (après une incubation entre 0,75 et 4 heures) a généré des concentrations d'OVTX aérosolisées comprises entre 49 et 69 pg équivalent PLTX.L⁻¹ d'air en phase exponentielle de croissance (Médina-Pérez *et al.*, 2021). À noter que

si l'abondance cellulaire lors de cette expérimentation était 10 fois supérieure à celle mesurée en milieu naturel dans l'étude citée précédemment (Ciminiello *et al.*, 2014), les concentrations en OVTX aérosolisées mesurées dans les deux études sont comparables. Ceci suggère que l'abondance cellulaire d'*Ostreopsis* n'est pas l'unique facteur contrôlant les concentrations en toxines dans les aérosols. En particulier, la phase de croissance de la microalgue pourrait avoir une forte influence sur la concentration en toxines dans les aérosols comme le suggère la deuxième expérimentation réalisée par Médina-Pérez *et al.* (2021). Dans cette étude, une incubation similaire réalisée en phase stationnaire de croissance pendant 21 heures a généré l'aérosolisation de 3 à 4 pg équivalent PLTX.L⁻¹ d'air, et ce malgré des concentrations cellulaires bien plus fortes que dans la première expérience (de 315 000 et 521 000 cellules.L⁻¹).

Dans les travaux de Casabianca *et al.* (2013), des débris cellulaires d'*Ostreopsis* ont été détectés dans les aérosols par des outils moléculaires (qPCR) à 0,5 et 3 m au-dessus du niveau de la mer. Les échantillons d'aérosols avaient été collectés pendant une durée similaire (6 - 7h) à celle de l'étude de Ciminiello *et al.* (2014), mais avec un débit de collecte 30 fois supérieur (30 m³.h⁻¹). Une corrélation positive entre l'abondance cellulaire dans le compartiment benthique et l'abondance de débris cellulaires dans les aérosols a été observée uniquement sur certains sites, les auteurs suggérant de nouveau que les conditions de vent pourraient être à l'origine de cette variabilité. Par ailleurs, une estimation théorique des concentrations attendues en OVTX-a a été réalisée à partir des abondances de débris cellulaires mesurées dans les aérosols. Ces concentrations estimées sont en deçà des seuils de détection (<50pg Casabianca *et al.*, 2013) et de quantification des outils de chimie analytique actuels de type LC-FLD, ce qui pourrait expliquer l'absence de détection des toxines dans les aérosols dans la plupart des campagnes de terrain réalisées dans le cadre d'études de recherche académique (Berdalet, pers. com., Ternon, pers. com.).

7.3 Produits de la mer

Les niveaux de contamination des produits de la mer par des toxines du groupe de la PLTX, en lien avec les proliférations d'*Ostreopsis cf. ovata*, décrits dans la littérature scientifique sont synthétisés et présentés ci-après. Les concentrations indiquées dans les différents tissus sont toutes exprimées en poids frais (PF).

Les données disponibles à l'international ne sont pas issues de programmes officiels de surveillance puisque les teneurs des produits de la mer en ces toxines ne sont pas réglementées. Elles proviennent d'études ponctuelles relatives à l'investigation de cas d'intoxications humaines ou visant à collecter des données d'occurrence concernant ces composés émergents qui présentent un risque sanitaire. L'ensemble des continents est concerné par la présence des toxines d'*Ostreopsis* et une grande variété d'organismes marins pourrait y être exposée, qu'il s'agisse de mollusques, d'échinodermes, de crustacés ou même de poissons.

Les données françaises recueillies en région PACA (Provence-Alpes-Côte d'Azur) l'ont été pendant une période de forte chaleur survenue en août 2006. Au cours de cet épisode, des prélèvements d'eau avaient été réalisés suite à des cas d'intoxication de plongeurs ayant

présenté des symptômes irritatifs au niveau de la bouche et de la gorge. Les concentrations cellulaires en *Ostreopsis cf. ovata* dans l'eau avaient atteint 900 000 cellules par litre, ce qui avait conduit à une interdiction de la baignade et de la consommation des produits de la mer dans la zone touchée (Villefranche-sur-Mer, îles du Frioul au large de Marseille). En juillet 2007, les analyses chimiques réalisées sur des prélèvements d'*Ostreopsis* ont révélé la présence d'isob-PLTX et d'OVTX-a. Enfin, durant l'été 2008, l'Ifremer a mis en évidence, pour la première fois, la présence de ces toxines dans des oursins de Méditerranée (Villefranche-sur-Mer, Morgiret), associée à la présence d'*O. cf. ovata* (Amzil *et al.*, 2012 ; Lemée *et al.*, 2012 ; Séchet *et al.*, 2012).

L'augmentation de la fréquence d'apparition des proliférations d'*Ostreopsis cf. ovata* en Méditerranée a conduit l'Ifremer, en collaboration avec le Laboratoire d'Océanographie de Villefranche et l'Anses, à mettre en place des suivis de terrain au cours de la période 2008-2012 pour : i) suivre la dynamique estivale du développement des proliférations d'*Ostreopsis cf. ovata* et ii) évaluer le niveau d'accumulation des toxines du groupe de la PLTX dans les produits de la mer (moules, échinodermes, poissons, gastéropodes, céphalopodes). Ce suivi a concerné les sites touchés par *Ostreopsis cf. ovata* : Morgiret (îles du Frioul) et Villefranche-sur-Mer. Les résultats de ce suivi sont présentés dans les sections 7.3.1 à 7.3.6.

7.3.1 Mollusques bivalves

7.3.1.1 Données internationales

Moules

Les données de la littérature faisant état de la présence de PLTX et/ou de ses analogues dans des moules prélevées entre 2006 et 2021 concernent trois zones géographiques : l'Italie (incluant la mer Tyrrhénienne et la mer Adriatique), la mer Egée et le Brésil. Les études citées ci-dessous portent sur trois espèces de moules : *Mytilus galloprovincialis* (Italie, mer Egée), *Perna perna* (Brésil) et *Modiolus barbatus* (mer Egée).

Les concentrations en toxines du groupe de la PLTX trouvées dans la chair des moules, quelle que soit leur origine, sont comprises entre <LQ³⁵ et 625 µg.kg⁻¹ de chair (Accoroni *et al.*, 2022; Ciminiello *et al.*, 2011; Milandri *et al.*, 2013; Tibirica *et al.*, 2019; Aligizaki *et al.*, 2008; EFSA 2009; Espina *et al.*, 2009). Ces résultats sont issus d'analyses par LC-MS/MS (Italie, Brésil) et par un test hémolytique quantitatif (mer Egée). Les concentrations en toxines les plus importantes dans la chair totale ont été rapportées en Italie (625 µg.kg⁻¹), suivi de la mer Egée (300 µg.kg⁻¹) et du Brésil (131 µg.kg⁻¹). L'analyse par LC-MS/MS de la glande digestive d'un échantillon de moules prélevé en Italie en 2007 a rapporté une concentration de 120 µg.kg⁻¹.

Les profils toxiques déterminés par LC-MS/MS dans les moules analysées en Italie et au Brésil montrent des compositions similaires, avec l'OVTX-a comme analogue majoritaire (66-100%), suivi de l'OVTX-b (26-34%) (Accoroni *et al.*, 2022; Milandri *et al.*, 2013; Tibirica *et al.*, 2019) et des OVTX-c et -e mais en proportions bien plus faibles (6,2 et 3,8% respectivement) (Tibirica *et al.*, 2019). En revanche, ni l'isob-PLTX, ni les OVTX-d, -f n'ont été retrouvés (Accoroni *et al.*, 2022; Milandri *et al.*, 2013; Tibirica *et al.*, 2019).

³⁵ Seules deux études mentionnent les LQ (Accoroni *et al.*, 2022 : 13 µg.kg⁻¹ ; EFSA, 2009 : 9 et 120 µg.kg⁻¹).

Autres bivalves

Les seules données relatives à la contamination de palourdes concernent la zone Caraïbes et la Grèce (mer Egée).

Concernant la zone Caraïbes, Gleibs et Mebs (1999) rapportent des concentrations comprises entre 8,3 et 258 unités hémolytiques (UH)/g dans divers bivalves (*Arca imbricata*, *Barbatia candida*, *Chama macerophylla* et *Atrina sp.*) prélevés à Santa Marta (Colombie) en 1995 et analysés par le test hémolytique. En utilisant un facteur de conversion indiqué par ces auteurs mais dont l'origine n'a pas pu être ni établie, ni vérifiée, ces concentrations équivaldraient à des concentrations en équivalent PLTX comprises entre 3 300 et 103 200 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (1 UH = 0,4 $\mu\text{g PLTX}$). Il s'agit des niveaux de contamination parmi les plus élevés, rapportés dans des organismes marins, mais ceux-ci sont à considérer avec prudence compte tenu de la technique analytique utilisée, du manque d'information concernant les performances qui lui sont associées et de l'absence de confirmation non équivoque de la présence de PLTX et/ou de ses analogues.

Concernant les données grecques, parmi les résultats notifiés à l'EFSA figure un échantillon de palourde collecté lors d'une campagne qui s'est déroulée entre 2004 et 2006 mais ce résultat est agrégé avec ceux des 10 échantillons de moules, sans qu'il soit possible d'en connaître le détail (EFSA, 2009).

Une seule publication fait état de la présence de PLTX dans un échantillon de praires *Venus verrucosa* prélevé à Lesbos, en mer Egée septentrionale, en octobre 2005 (Aligizaki *et al.*, 2008). Si les auteurs rapportent une activité hémolytique caractéristique de celle de la PLTX, aucune donnée quantitative n'est disponible.

7.3.1.2 Données françaises - Méditerranée

Moules

En l'absence de zone de production de mollusques bivalves filtreurs dans les zones qui ont été touchées par *Ostreopsis*, le suivi de la contamination des moules a nécessité l'immersion préalable en un seul point dans la zone touchée par *Ostreopsis*, à la fin juin 2009, de moules (*Mytilus galloprovincialis*, Lamarck 1819) en poche (espèce ayant une grande capacité de bioaccumulation). Entre juin et septembre 2009, 25 échantillons de ces moules ont été analysés. Les concentrations mesurées dans la glande digestive étaient comprises entre une valeur inférieure à la LD ($9 \mu\text{g.kg}^{-1}$) et $38 \mu\text{g.kg}^{-1}$ pour l'isob-PLTX, d'une part, et entre une valeur inférieure à la LD et $179 \mu\text{g.kg}^{-1}$ pour l'OVTX-a, d'autre part. La concentration totale maximale dans la glande digestive (isob-PLTX + OVTX-a) a été observée à Marseille en août 2009 avec $217 \mu\text{g PLTX eq.kg}^{-1}$. Les concentrations mesurées dans le reste de la chair (c'est-à-dire hors glande digestive) étaient inférieures à la LD ($< 9 \mu\text{g.kg}^{-1}$).

Pour le site de Morgiret, durant le suivi de la contamination *in situ*, deux pics de toxicité ont été observés début août et mi-septembre. Cette observation est en accord avec le suivi des concentrations cellulaires d'*Ostreopsis* spp *in situ* qui montrait deux pics de forte abondance fin juillet et début septembre. La fin de l'épisode toxique semble se situer vers la fin septembre puisqu'aucune toxine du groupe de la PLTX n'a été détectée dans les glandes digestives de moules en octobre 2009 (Amzil *et al.*, 2012).

Autres bivalves

Deux échantillons d'une autre espèce de mollusques bivalves, l'Arche de Noé (*Arca noae*), ont été analysés durant l'été 2010. La concentration maximale en toxines était de 5,2 µg eq. PLTX.kg⁻¹ de chair totale (Biré *et al.*, 2015).

Le Tableau VIII synthétise l'ensemble des données disponibles sur la contamination des mollusques bivalves par les toxines du groupe de la PLTX.

Tableau VIII : Concentrations en toxines du groupe de la PLTX dans les mollusques

| Référence | Toxine (s) | Espèces | Origine | Concentrations µg.kg ⁻¹ poids frais |
|---|--------------------------------|---|--|---|
| Aligizaki <i>et al.</i> (2008) | isob-PLTX | Moules (<i>Mytilus galloprovincialis</i>), praire (<i>Venus verrucosa</i>), Moules (<i>Modiolus barbatus</i>) | Mer Egée | 4 échantillons de moules (80 g de chair totale), extraction selon Taniyama <i>et al.</i> 2002 : 2 extraits (aqueux et n-butanol) et dosage par test hémolytique en µg.kg ⁻¹ de chair totale. LD/LQ non précisées. Phase aqueuse Butanol Total 76,97+/-3,55 19,9+/-6,14 96,8 72,77+/-4,02 24,37+/-9,63 97,0 18,17+/-3,54 21,87+/-1,23 39,9 20,17+/-6,20 13,27+/-2,23 33,3 |
| Aligizaki <i>et al.</i> (2011) Article de revue. | isob-PLTX et OVTX-a | Moules (<i>Mytilus galloprovincialis</i>) | Grèce, Mer Egée Italie (Adriatique) | Nombre d'échantillons non précisé. 50,0–137,9 µg eq. PLTX.kg ⁻¹ de chair totale par test cytotytique, 120 µg.kg ⁻¹ de glande digestive (LC-MS/MS). Bellucci <i>et al.</i> 2008 : 200* µg.kg ⁻¹ de glande digestive (cytotytique), *valeur corrigée par Rossini (pers. com, dans Aligizaki <i>et al.</i> 2011.) de la valeur initiale de 3280 µg.kg ⁻¹ . LD/LQ non précisées. |
| Amzil <i>et al.</i> (2012) | isob-PLTX OVTX-a | Moules immergées (<i>Mytilus galloprovincialis</i>) | France, Méditerranée (Villefranche) | Optimisation de la quantification de l'isob-PLTX par LC-MS/MS. Rendement d'extraction avec MeOH/H ₂ O : 95%. Application sur différentes matrices de coquillages : moules (97%) et palourdes (90%). LD et LQ = 9 et 23 µg PLTX.kg ⁻¹ pour les moules. 25 échantillons de moules. Concentration totale maximale (isob-PLTX + OVTX-a) dans la glande digestive observée en août 2009 avec 217 µg eq. PLTX.kg ⁻¹ . Aucune toxine détectée dans la chair restante (< LD : 9 µg.kg ⁻¹). |
| Biré <i>et al.</i> (2015) | isob-PLTX PLTX eq OVTX-a | Arche de Noé (<i>Arca noae</i>) | Baie de Villefranche-sur-Mer (Rochambault) | Deux individus prélevés entre juillet et septembre 2010. Analyse de première intention avec le test hémolytique (TH) et analyse de confirmation par LC-MS/MS. La LQ du TH est de 1,2 µg eq. PLTX.kg ⁻¹ et les LD/LQ de la LC-MS/MS sont respectivement de 7,4 et 24,5 µg PLTX.kg ⁻¹ . Utilisation de l'approche lower et upper bound (LB/UB) pour traiter les données même lorsqu'elles sont censurées (valeurs <LD ou <LQ). Concentration maximale : 5,2 µg eq. PLTX.kg ⁻¹ de chair totale avec une moyenne de 3,8 µg PLTX eq. PLTX.kg ⁻¹ |

| Référence | Toxine (s) | Espèces | Origine | Concentrations $\mu\text{g.kg}^{-1}$ poids frais |
|---|---------------------|--|---|---|
| Ciminiello <i>et al.</i> (2011) ORSA (2011) Microsoft Word - Report Ostreopsis ovata 2007-2010 (orsacamp ania.it) | PLTX OVTX-a | Moule | Italie | <p>Prélèvements entre 2007 et 2010, nombre d'échantillons non précisé, analyse par LC-MS/MS, LD/LQ non précisées.</p> <p>Rendement d'extraction : 49-61%</p> <p>OVTX-a détectée dans la plupart des échantillons de moules avec des concentrations entre 303 et 625 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, PLTX détectée dans aucun échantillon.</p> <p>Les concentrations en OVTX-a maximales mesurées étaient :</p> <ul style="list-style-type: none"> - sur le site de Gaiola, dans la gamme 38-110 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (année 2007), 321-518 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (année 2008), 45-229 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (année 2009), 22-66 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (année 2010). Chaque année, le pic de concentration se situe entre fin juin et début août puis la concentration diminue jusqu'à des niveaux non détectables pour la période septembre-octobre, sauf pour l'année 2009 au cours de laquelle un retour de la toxicité a été enregistré dans la première dizaine de septembre (55 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). - sur le site de Rocche Verdi, 147 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (année 2007), 82-625 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (année 2008), 63-207 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (année 2009), 13-216 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (année 2010). Chaque année, le pic de concentration se situe entre la fin juillet et le début août, puis la concentration diminue jusqu'à des niveaux non détectables, pour atteindre ensuite un nouveau maximum entre septembre et octobre. - sur le site de Nisida, 107-482 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (année 2008), 93-161 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (année 2009), 42 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (année 2010). Chaque année, le pic se situe entre mi-juillet et début août puis la concentration diminue jusqu'à des niveaux non détectables en octobre. - sur le site de Punta Pennata, 303-446 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (année 2008), 11-37 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (année 2009), 6-45 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (année 2010) |
| EFSA (2009) | isob-PLTX OVTX-a | Moules | France (16 résultats) Italie (35) Grèce | <p>51 résultats par LC-MS/MS, échantillons collectés en 2009 pour la France et en 2007/2008 pour l'Italie.</p> <p>LD/LQ = 2 et 9 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pour la France*, 36 et 120 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pour l'Italie</p> <p>* valeurs corrigées LD/LQ = 9 et 23 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (Amzil <i>et al.</i>, 2012)</p> <p>Moyenne (somme PLTX et OVTX-a) = 122 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (LB), 158 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (UB)</p> <p>P95 = 462 $\mu\text{g.kg}^{-1}$</p> <p>Maximum = 625 $\mu\text{g.kg}^{-1}$</p> <p>% d'échantillons quantifiés = 43,1 %</p> <p>10 résultats pour les moules et 1 pour les palourdes : résultat négatif par le test hémolytique (LD = 0,0016 $\mu\text{g.kg}^{-1}$).</p> |
| Gleibs <i>et al.</i> , (1999) | PLTX eq | Moules (<i>Arca imbricata</i> , <i>Atrina sp.</i> , <i>Barbatia candida</i> , <i>Chama macerophylla</i>) | Santa Marta, Colombie, Mer des Caraïbes | <p>N = 7, prélevés en 1995, test hémolytique, concentrations entre 8,3 et 258 UH/g.</p> <p>1 unité hémolytique (UH) correspond à 0,4 μg de PLTX.</p> |

| Référence | Toxine (s) | Espèces | Origine | Concentrations $\mu\text{g.kg}^{-1}$ poids frais |
|-------------------------------|--|--|--|--|
| Milandri <i>et al.</i> (2013) | isob-PLTX et OVTX-a | Moules | Italie (Toscane), Mer Tyrrhénéenne | Analyse par LC-MS/MS et test hémolytique (TH). LD/LQ non précisées, 2 échantillons prélevés en juillet et août 2008 (durant une prolifération d' <i>Ostreopsis ovata</i>). Concentration en OVTX-a : 131 et 228 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de chair totale (isob-PLTX < LQ). Par TH : 103 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pour l'échantillon à 228 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ par LC-MS/MS Mortalité de patelles. |
| Tibiricá <i>et al.</i> (2019) | PLTX OVTX-a | Moules (<i>Perna perna</i>) | Brésil Sud (Archipel des Currais), | n = 10 dont 5 déplacés près des sites de la prolifération d' <i>Ostreopsis cf ovata</i> , été 2017. Analyse par LC-MS/MS (par individu). LD/LQ non précisées. Accumulation d'ovatoxines (OVTX-a, -b, -c, et -e) (OVTX-d < LD), avec un maximum de 131 $\mu\text{g OVTX.kg}^{-1}$ (moyenne 98 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ sur 5 individus) après exposition de 24h à la prolifération : 68% OVT-a, 27% OVTX-b, 10% OVTX-c, 4,5% OVTX-e. Les 5 individus non déplacés ont été également contaminés avec un maximum de 32,9 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (moyenne de 22,3 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). |
| Accoroni <i>et al.</i> (2022) | OVTX-a OVTX-b OVTX -d, -e, -c, et isob-PLTX non détectés | Moules (<i>Mytilus galloprovincialis</i>) 5-7 cm | Rivière Conero au nord de la mer adriatique Passetto (43°37'09" N, 13°31'54" E) and Portonovo (43°33'41" N 13°36'06" E) | Moules prélevées d'août à octobre 2021 (n= 30 échantillons de 20 individus), fréquence hebdomadaire pendant une prolifération d' <i>O. cf. ovata</i> Témoin matrice négatif (CRM-zero_Mus) NRC CRM Halifax Analyse LC-MS/MS 3200QTRAP ESI : LD 5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$; LQ 13 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ UHPLC-HRMS (identification par suivi de l'ion précurseur et de 1 ou 2 ions produits), LQ : 1 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ Abondance relative des toxines dans les moules (chair totale) : OVTX-a (71-74%) et OVTX-b (26-29%). Passetto : OVTX détectées 32 jours après l'apparition des cellules sur les macroalgues et 18 jours après la première mesure dans la colonne d'eau (sans précision sur les analogues d'OVTX). Concentration maximale mesurée 4 jours après le pic de la prolifération : 15,8 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ par LC-MS/MS et 15,7 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ par UHPL-HRMS. 8 jours plus tard ces concentrations en toxine de même que celles de cellules dans la colonne d'eau avaient drastiquement diminué (<LD). Ensuite, 14 jours sans cellules dans l'eau et toxines dans les moules. Portonovo : 36,4 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ par LC-MS/MS et 25,5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ par UHPL-HRMS dans la chair totale. Ces concentrations sont bien plus élevées que celles mesurées à Passetto alors que les cellules n'y étaient pas plus abondantes. OVTX, -d, -e, -c, et isob-PLTX non détectés Profil toxique similaire à celui des algues |

Concernant les toxines potentiellement produites par *Ostreopsis siamensis*, Rhodes *et al.* (2002) ont étudié la contamination de coquillages (moules, coquilles St-Jacques, huîtres du Pacifique) en les cultivant dans un milieu contenant une souche néo-zélandaise d'*Ostreopsis siamensis* pendant 27 et 84 h. La présence d'une activité de type PLTX a été déterminée sur la base du test hémolytique, mais sans confirmation par analyse chimique. Dans ces conditions, aucune activité hémolytique n'a été détectée dans les moules (glande digestive, chair). Pour les huîtres, une faible activité hémolytique a été détectée dans la glande digestive et la chair. Les pétoncles ont présenté des activités hémolytiques plus élevées que les huîtres dans la glande digestive (équivalent à une concentration de 1 ng eq PLTX.g⁻¹). Cette activité hémolytique pourrait être due à de l'OST-D, une toxine du groupe de la PLTX produite par *Ostreopsis siamensis*.

7.3.2 Crustacés

7.3.2.1 Données internationales

La revue de la bibliographie montre que des contaminations attribuées à la PLTX ont été rapportées chez des crabes dans l'archipel des Philippines, en mer de Chine et dans les Caraïbes. Les espèces concernées sont *Demania alcalai* et *D. reynaudi* (Philippines), *Lophozozimus pictor* (Philippines, mer de Chine) et *Platypodiella spectabilis* (Caraïbes).

Les données disponibles ont été acquises par bioessai sur souris et alors exprimées en unité souris (US)/g (Philippines, mer de Chine) ou par test hémolytique et alors exprimées en UH/g (Caraïbes). Dans ce dernier cas, il était possible de les convertir en µg PLTX.g⁻¹, en utilisant un facteur de conversion non vérifié (cf. réserves exprimées précédemment) ce qui rend l'exploitation de ces données très difficile.

Les bioessais sur souris pratiqués sur des crabes des Philippines et de mer de Chine ont révélé des niveaux de toxicité du même ordre de grandeur que les crabes soient impliqués ou non dans des cas d'intoxication (Yasumoto *et al.*, 1986; Alcalá *et al.*, 1988; Lau *et al.*, 1993). L'analyse des différents organes et tissus des crabes ont montré que les viscères, les branchies et les œufs sont les parties les plus contaminées (Yasumoto *et al.*, 1986).

Pour la zone caraïbe, les concentrations en PLTX déterminées par le test hémolytique pour trois spécimens du crabe clown *Platypodiella spectabilis* pêchés à Santa Marta (Colombie) en 1995 seraient comprises entre 8 et 20 µg eq PLTX. g⁻¹ après application du facteur de conversion (1 UH = 0,4 µg PLTX) (Gleibs et Mebs, 1999), avec toujours les mêmes réserves qu'exprimées précédemment. La présence de PLTX serait en lien avec le fait que les crabes clowns nichent dans les colonies de *Palythoa caribaeorum*, elles-mêmes contaminées en PLTX (Gleibs et Mebs, 1999).

7.3.2.2 Données françaises - Méditerranée

Entre juin et septembre 2009 et 2010, l'analyse par test hémolytique de la chair totale d'une quarantaine d'échantillons issus de différentes espèces de crabes (n = 34) et d'araignées de mer (n = 5) ont montré la présence de toxines du groupe de la PLTX avec une concentration maximale par le test hémolytique de 51,3 µg eq. PLTX.kg⁻¹ de chair dans les échantillons d'araignée de mer et 38,4 µg eq. PLTX.kg⁻¹ de chair de crabe (Biré *et al.*, 2013 ; 2015).

Le Tableau IX synthétise l'ensemble des données disponibles sur la contamination des crustacés par les toxines du groupe de la PLTX.

Tableau IX : Concentrations en toxines du groupe de la PLTX dans les crustacés

| Référence | Toxine(s) | Espèces | Origine | Concentrations $\mu\text{g.kg}^{-1}$ poids frais |
|---|--------------------------------|---|--|---|
| Aligizaki <i>et al.</i> (2011) Article de revue. | eq PLTX | Crabe (<i>Demania alcala</i>) | Philippines | 1.210 ⁶ US/individu ; 5400 US.g ⁻¹ (viscères) ; 16000 US.g ⁻¹ (branchies) par bioessai sur souris (confirmation HPLC) n=2, valeur max des 2 crabes. |
| | | Crabe (<i>Lophozozimus pictor</i>) | Philippines | 10000 US.g ⁻¹ par bioessai sur souris (HPLC confirmation) valeur max de n = 4 (200, 6000, 6000, 10 000 viscères et 180, 3000, 2400, 2200 branchies). |
| | | Crabe (<i>Demania reynaudii</i>) | Philippines | 76,9 US.g ⁻¹ (pattes) par bioessai sur souris (confirmation HPLC), cas mortel chez l'Homme , n=1 crabe |
| | | Crabe (<i>Lophozozimus pictor</i>) | Chine, Singapour | 5 000 US/g extrait brut et 400 000 US.g ⁻¹ extrait purifié (intoxication non mortelle) n =1 crabe (1 malade décrit et mention de plusieurs autres personnes exposées) |
| | | Crabe (<i>Platypodiella spectabilis</i>) | SW Caraïbes, Santa Marta, Colombie | 350 UH.g ⁻¹ (140 μg eq PLTX.g ⁻¹) n=3 crabes LD/LQ non précisées |
| Biré <i>et al.</i> (2013) | isob-PLTX PLTX eq | <i>Maja squinado</i> , <i>Eriphia verrucosa</i> | Nice et Villefranche-sur-Mer | Prélèvements effectués entre juin et septembre 2009. Analyse de première intention avec le test hémolytique (TH) et analyse de confirmation par LC-MS/MS. La LQ du TH est de 1,2 μg eq PLTX.kg ⁻¹ et les LD/LQ de la LC-MS/MS sont respectivement de 7,4 et 24,5 μg PLTX.kg ⁻¹ . Analyse de la chair totale de 21 individus de crabe (<i>Eriphia verrucosa</i>) et 2 araignées de mer (<i>Maja squinado</i>) Concentrations (en μg eq. PLTX.kg ⁻¹) : <i>M. squinado</i> (8,3), <i>E. verrucosa</i> (38,4) |
| Biré <i>et al.</i> (2015) | isob-PLTX PLTX eq OVTX-a | <i>Pachygrapsus marmoratus</i> , <i>Maja squinado</i> , <i>Eriphia verrucosa</i> , <i>Xantho poressa</i> | Baie de Villefranche-sur-Mer (Rochambault) | Prélèvements effectués entre juillet et septembre 2010 Analyse de première intention avec le test hémolytique (TH) et analyse de confirmation par LC-MS/MS. La LQ du TH est de 1,2 μg eq. PLTX.kg ⁻¹ et les LD/LQ de la LC-MS/MS sont respectivement de 7,4 et 24,5 μg PLTX.kg ⁻¹ . Utilisation de l'approche lower et upper bound (LB/UB) pour traiter les données même lorsqu'elles sont censurées (valeurs <LD ou <LQ). 16 échantillons de 4 espèces différentes de crustacés Les 4 espèces prélevées contenaient des toxines du groupe de la PLTX, avec des concentrations maximales comprises entre 3,6 et 16,2 μg eq. PLTX kg ⁻¹ chair totale pour 3 d'entre elles. L'araignée de mer <i>Maja squinado</i> est l'organisme le plus contaminé avec une concentration maximale de 51,3 μg eq. PLTX.kg ⁻¹ chair totale et des concentrations excédant la valeur guide de l'EFSA pour 33% des prélèvements. La concentration moyenne en toxines de <i>M. squinado</i> est de 22,6 / 23,0 μg eq. PLTX.kg ⁻¹ chair totale (LB/UB). |
| Gleibs <i>et al.</i> , (1999) | PLTX eq | Crabe clown (<i>Platypodiella spectabilis</i>) | Santa Marta, Colombie, Mer des Caraïbes | N = 3, prélevés en 1995, test hémolytique, concentrations entre 20 et 50 HU.g ⁻¹ . 1 UH correspond à 0,4 μg de PLTX. LD/LQ non précisées. |

7.3.3 Céphalopodes

7.3.3.1 Données internationales

Les seules données disponibles au niveau international sur la contamination des céphalopodes concernent un poulpe échoué en mer Tyrrhénienne (Italie) en juillet 2008, durant une prolifération d'*Ostreopsis ovata*. Des analyses réalisées par LC-MS/MS ont révélé la présence de 971 $\mu\text{g OVTX-a.kg}^{-1}$ et de 115 $\mu\text{g isob-PLTX.kg}^{-1}$ dans la chair totale. L'analyse par le test hémolytique a donné un résultat plus faible de moitié, de l'ordre de 466 $\mu\text{g eq. PLTX.kg}^{-1}$ (Milandri *et al.*, 2013).

7.3.3.2 Données françaises - Méditerranée

En août 2009, deux échantillons de poulpe *Octopus vulgaris* analysés par test hémolytique contenaient des toxines du groupe de la PLTX avec une concentration maximale de 16,9 $\mu\text{g eq. PLTX.kg}^{-1}$ de chair totale de poulpe (Biré *et al.*, 2013). Les cinq échantillons de poulpe *Octopus vulgaris* prélevés pendant l'été 2010 contenaient également des toxines avec une concentration maximale de 18,3 $\mu\text{g eq. PLTX.kg}^{-1}$ chair totale (Biré *et al.*, 2015).

Le tableau X synthétise l'ensemble des données disponibles sur la contamination des céphalopodes par les toxines du groupe de la PLTX.

Tableau X : Concentrations en toxines du groupe de la PLTX dans les céphalopodes

| Référence | Toxine(s) | Espèces | Origine | Concentrations $\mu\text{g.kg}^{-1}$ poids frais |
|---|--------------------------------|-------------------------|--|---|
| Aligizaki <i>et al.</i> (2011) Article de revue. | isob-PLTX et OVTX-a | Pieuvres | Mer Tyrrhénienne | 971 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ OVTX-a / 115 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ isob-PLTX par LC-MS/MS Nombre d'échantillons non précisé, LD/LQ non précisées. |
| Biré <i>et al.</i> (2013) | isob-PLTX PLTX eq | <i>Octopus vulgaris</i> | Nice et Villefranche-sur-mer | Prélèvements effectués entre juin et septembre 2009. Analyse de première intention avec le test hémolytique (TH) et analyse de confirmation par LC-MS/MS. La LQ du TH est de 1,2 $\mu\text{g eq. PLTX.kg}^{-1}$ et les LD/LQ de la LC-MS/MS sont respectivement de 7,4 et 24,5 $\mu\text{g PLTX.kg}^{-1}$. Analyse du tube digestif et de la chair restante séparément. Puis calcul de la concentration en toxines dans la chair totale en fonction des contributions de chacune des parties analysées. Deux individus. Concentration max (en $\mu\text{g eq. PLTX.kg}^{-1}$) : 16,9 |
| Biré <i>et al.</i> (2015) | isob-PLTX PLTX eq OVTX-a | <i>Octopus vulgaris</i> | Baie de Villefranche-sur-mer (Rochambault) | Prélèvements effectués entre juillet et septembre 2010 Analyse de première intention avec le test hémolytique (TH) et analyse de confirmation par LC-MS/MS. La LQ du TH est de 1,2 $\mu\text{g eq. PLTX.kg}^{-1}$ et les LD/LQ de la LC-MS/MS sont respectivement de 7,4 et 24,5 $\mu\text{g PLTX.kg}^{-1}$. Utilisation de l'approche lower et upper bound (LB/UB) pour traiter les données même lorsqu'elles sont censurées (valeurs <LD ou <LQ) . Cinq individus analysés. La concentration maximale en toxines chez le poulpe <i>O. vulgaris</i> est de 18,3 $\mu\text{g eq.PLTX.kg}^{-1}$ chair totale, avec une moyenne sur l'ensemble des prélèvements de 6,1 / 6,3 $\mu\text{g eq. PLTX.kg}^{-1}$ chair totale (LB/UB). |

| Référence | Toxine(s) | Espèces | Origine | Concentrations $\mu\text{g.kg}^{-1}$ poids frais |
|-------------------------------|-------------------|---------|------------------------------------|---|
| Milandri <i>et al.</i> (2013) | isob-PLTX et OVTX | Poulpe | Italie (Toscane), Mer Tyrrhénienne | Analyse par LC-MS/MS et test hémolytique (TH). LD/LQ non précisées, 1 échantillon de poulpe échoué prélevé en juillet 2008 (durant une prolifération d' <i>Ostreopsis ovata</i>). Concentration en OVTX-a : $971 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de chair totale Concentration en isob-PLTX : $115 \mu\text{g.g}^{-1}$ de chair totale Par TH : $466 \mu\text{g eq. PLTX.kg}^{-1}$ |

7.3.4 Echinodermes

7.3.4.1 Données internationales

Oursins

Les données de contamination des oursins au niveau international sont uniquement issues d'études italiennes.

Quatre échantillons d'oursin *Paracentrotus lividus* pêchés en mer Tyrrhénienne ont été analysés par LC-MS/MS et les concentrations en OVTX-a rapportées dans la chair totale sont comprises entre la LQ (non spécifiée) et $164 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Les analyses par test hémolytique de neutralisation, réalisés sur les trois échantillons les moins contaminés, ont donné des résultats concordants avec ceux de la LC-MS/MS (Milandri *et al.*, 2013). Le niveau de contamination rapporté par Bellocchi *et al.* (2008b, 2008a) pour des oursins *P. lividus* pêchés en Ligurie en 2006 est bien plus élevé ($8\,980 \mu\text{g eq. PLTX.kg}^{-1}$). Ce résultat est à prendre avec précaution puisque certains des résultats de cette étude (sur moules) ont fait l'objet d'une correction par la suite (Rossini, communication personnelle, dans Aligizaki *et al.*, 2011, cf paragraphe Moules [7.3.1.1.]). Des données issues de l'analyse de vingt et un échantillons d'oursins collectés en Italie entre 2007 et 2008, ont été notifiées à l'EFSA. Ces résultats agrégés avec ceux des oursins français ne permettent pas d'avoir le détail des concentrations dans les oursins italiens (EFSA, 2009).

Holothuries

Un spécimen de concombre de mer *Holothuria grisea* prélevé durant l'été 2017 dans le Sud du Brésil (Archipel de Currais), lors d'une prolifération d'*Ostreopsis cf. ovata*, a été analysé par LC-MS/MS. Aucune toxine n'a été détectée dans la chair totale (Tibiriçá *et al.*, 2019, valeur de la limite de détection non mentionnée).

7.3.4.2 Données françaises - Méditerranée

Durant les étés des années 2008 à 2012, 65 oursins (*Paracentrotus lividus*) ont été prélevés et analysés, soit en LC-MS/MS, soit par test hémolytique suivi d'une confirmation en LC-MS/MS (Amzil *et al.*, 2012 ; Biré *et al.*, 2013 ; 2015 ; Brissard *et al.*, 2014).

Les concentrations totales maximales observées dans le tube digestif d'oursins étaient de 458, 180, 108 et $423 \mu\text{g eq. PLTX.kg}^{-1}$ en 2008, 2009, 2010 et 2012 respectivement. Concernant les échantillons de chair restante, les concentrations mesurées étaient inférieures à la LD.

Les concentrations en toxines mesurées dans les oursins sont généralement plus élevées que celles trouvées dans les moules (glande digestive).

Durant la période 2008-2012, les niveaux d'accumulation des toxines du groupe de la PLTX dans de nombreux échantillons d'oursins ont dépassé largement la valeur guide de $30 \mu\text{g}$

(PLTX + OST-D).kg⁻¹ recommandée par l'EFSA, pendant les proliférations estivales d'*Ostreopsis cf. ovata*. Bien que (i) la récolte des oursins soit interdite en période estivale et (ii) les parties comestibles des oursins soit les gonades (et non les viscères), la préoccupation sanitaire ne peut pas être exclue et à la demande de la DGAL, l'Ifremer a mis en place, dans le cadre du REPHY, une surveillance systématique des toxines du groupe de la PLTX dans les oursins en utilisant la LC-MS/MS durant la période 2009-2016, d'octobre à fin mars, afin de couvrir la période d'autorisation administrative de la pêche d'oursins en Méditerranée. Cette surveillance a concerné cinq points : zone de la Côte bleue – Parc marin (42 échantillons), Morgiret-Frioul (40 échantillons), zone des Embiez (42 échantillons), zone des îles de Lérins (26 échantillons), Baie d'Ajaccio (32 échantillons).

En janvier 2016, la DGAL a décidé d'arrêter cette surveillance systématique des oursins car aucune détection d'OVTX-a ou de PLTX n'a été observée durant la période hivernale de pêche d'oursins. Comme les PLTX sont des toxines non réglementées et relèvent de la veille d'urgence, la DGAL a donc maintenu le comptage d'*Ostreopsis* par le REPHY. Par ailleurs, depuis janvier 2018, les PLTX/OVTX et d'autres toxines émergentes (répertoriées ou non sur le littoral métropolitain) sont recherchées chaque mois dans le cadre du réseau EMERGTOX (veille d'urgence des biotoxines marines dans les coquillages). La méthode LC-MS/MS multi-toxines couvre plusieurs groupes de phycotoxines et cyanotoxines lipophiles et elle est donc non spécifique aux toxines du groupe PLTX. Ceci a un impact négatif sur la sensibilité puisque les limites de détection et de quantification sont respectivement de 150 et 450 µg.kg⁻¹ de glande digestive ou de chair totale.

Etoile de mer

L'analyse par test hémolytique d'un spécimen d'*Acanthaster* pourpre ou couronne du Christ, *Acanthaster planci* prélevé à Santa Marta (Colombie) a révélé des concentrations en PLTX de l'ordre de 29 UH.g⁻¹ dans l'estomac et 241 UH.g⁻¹ dans les diverticules intestinaux (Gleibs et Mebs, 1999), ce qui, au vu du facteur de conversion défini par les auteurs, équivaudrait à 11,6 et 96,4 µg eq. PLTX.g⁻¹. Ces concentrations sont importantes mais il convient de les considérer avec prudence pour les raisons évoquées précédemment (incertitudes sur le facteur de conversion).

Le Tableau XI synthétise l'ensemble des données disponibles sur la contamination des échinodermes par les toxines du groupe de la PLTX.

Tableau XI : Concentrations en toxines du groupe de la PLTX dans les échinodermes

| Référence | Toxine(s) | Espèces | Origine | Concentrations µg.kg ⁻¹ poids frais |
|---|---------------------|--|---|---|
| Aligizaki <i>et al.</i> (2011) Article de revue. | isob-PLTX et OVTX-a | Oursins (<i>Paracentrotus lividus</i>) | Mer de Ligurie Italie (mers de Ligurie, Tyrrhénienne, Adriatique) France (Méditerranée) | 500 µg.kg ⁻¹ par test cytolitique (Italie), nombre d'échantillons non précisé, LD/LQ non précisées 114-180 µg OVTX-a.kg ⁻¹ LC-MS et test hémolytique, nombre d'échantillons non précisé, LD/LQ non précisées 400 µg.kg ⁻¹ LC-MS/MS (Amzi <i>et al.</i> , 2009), nombre d'échantillons non précisé, LD/LQ non précisées |

| Référence | Toxine(s) | Espèces | Origine | Concentrations $\mu\text{g.kg}^{-1}$ poids frais |
|-------------------------------|--------------------------------|---|---|---|
| Amzil <i>et al.</i> (2012) | isob-PLTX OVTX-a | Oursins (<i>Paracentrotus lividus</i>) | France, Méditerranée (Villefranche- sur-Mer) | Optimisation de la quantification l'isob-PLTX par LC-MS/MS. Rendement d'extraction avec MeOH/H ₂ O : 92% pour les oursins. LD et LQ = 10 et 25 $\mu\text{g PLTX.kg}^{-1}$ pour les oursins. Concentration des toxines dans le tube digestif des oursins durant la prolifération estivale 2008-2009 (pas de toxines détectées dans les gonades) : Durant les étés 2008 et 2009, 23 oursins ont été prélevés à Morgiret et à Villefranche-sur-mer puis analysés en LC-MS/MS. Les concentrations mesurées dans le tube digestif étaient pour l'isob-PLTX comprises entre < LD (< 10 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) et 185 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, et pour OVTX-a entre < LD et 328 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. La concentration totale maximale a été observée dans le tube digestif d'oursins de Villefranche-sur-Mer en juillet 2008 avec une concentration de 458 $\mu\text{g eq. PLTX.kg}^{-1}$. Pour le site de Morgiret, deux phases de contamination avec deux pics de toxicité ont été observées (début août et mi-septembre 2009), en concordance avec le suivi de la concentration cellulaire d' <i>Ostreopsis</i> spp <i>in situ</i> . |
| Biré <i>et al.</i> (2013) | isob-PLTX PLTX eq | Oursins (<i>Paracentrotus lividus</i>) | Nice et Villefranche- sur-Mer | Prélèvements effectués entre juin et septembre 2009. Analyse de première intention avec le test hémolytique (TH) et analyse de confirmation par LC-MS/MS. La LQ du TH est de 1,2 $\mu\text{g eq. PLTX.kg}^{-1}$ et les LD/LQ de la LC-MS/MS sont respectivement de 7,4 et 24,5 $\mu\text{g PLTX.kg}^{-1}$. Analyse du tube digestif et de la chair restante séparément puis calcul de la concentration en toxines dans la chair totale en fonction des contributions de chacune des parties analysées. Au total, 24 individus analysés. Les concentrations trouvées dans le tube digestif étaient comprises entre < LQ et 180 $\mu\text{g eq. PLTX.kg}^{-1}$. Aucune toxine détectée dans la chair restante des échantillons |
| Biré <i>et al.</i> (2015) | isob-PLTX PLTX eq OVTX-a | Oursins (<i>Paracentrotus lividus</i>) | Baie de Villefranche- sur-Mer (Rochambault) | Prélèvements effectués entre juillet et septembre 2010 Analyse de première intention avec le test hémolytique (TH) et analyse de confirmation par LC-MS/MS. La LQ du TH est de 1,2 $\mu\text{g eq. PLTX.kg}^{-1}$ et les LD/LQ de la LC-MS/MS sont respectivement de 7,4 et 24,5 $\mu\text{g PLTX.kg}^{-1}$. Utilisation de l'approche lower et upper bound (LB/UB) pour traiter les données même lorsqu'elles sont censurées (valeurs <LD ou <LQ). 18 individus analysés. Les concentrations en toxines dans les échantillons d'oursins <i>P. lividus</i> sont comprises entre 0,8 / 1,3 et 107,6 / 108,0 $\mu\text{g eq. PLTX.kg}^{-1}$ chair totale (LB/UB). 33% des prélèvements sont au-dessus de la valeur guide de l'EFSA, et la moyenne de l'ensemble des échantillons d'oursins est de 30,3 / 30,7 $\mu\text{g eq. PLTX.kg}^{-1}$ chair totale (LB/UB), soit la valeur guide de l'EFSA. |
| Brissard <i>et al.</i> (2014) | isob-PLTX OVTX (a-f) | Oursins (<i>Paracentrotus lividus</i>) | France Villefranche- sur-Mer | Méthode analytique : LC-MS/MS. Extraction MeOH 90%. Analyses du tube digestif et le reste de la chair séparément. Accumulation dans les oursins (9/10) uniquement dans le tube digestif. Niveau de contamination: 103 à 423 $\mu\text{g eq}$ |

| Référence | Toxine(s) | Espèces | Origine | Concentrations $\mu\text{g.kg}^{-1}$ poids frais | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|---------------------|--|---------------------------------------|--|----------|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | | <p>PLTX (isob-PLTX+OVTX).kg^{-1} chair totale, avec une moyenne de 223 $\mu\text{g/kg}$, et donc une variabilité importante entre les individus.</p> <p>Test hémolytique : tests positifs seulement avec les extraits du tube digestif (pas de détection dans le reste de la chair).</p> <p>Résultats à partir d'extraits individuels de tube digestif d'oursins ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) pour N=4 analysés par les deux techniques</p> <table> <tr> <td>LC-MS/MS</td> <td>TH</td> </tr> <tr> <td>231</td> <td>247</td> </tr> <tr> <td>309</td> <td>270</td> </tr> <tr> <td>205</td> <td>201</td> </tr> <tr> <td>215</td> <td>179</td> </tr> </table> | LC-MS/MS | TH | 231 | 247 | 309 | 270 | 205 | 201 | 215 | 179 |
| LC-MS/MS | TH | | | | | | | | | | | | | |
| 231 | 247 | | | | | | | | | | | | | |
| 309 | 270 | | | | | | | | | | | | | |
| 205 | 201 | | | | | | | | | | | | | |
| 215 | 179 | | | | | | | | | | | | | |
| EFSA, 2009 | isob-PLTX OVTX-a | Oursins | France (19 résultats) Italie (21) | <p>40 résultats par LC-MS/MS, échantillons collectés en 2009 pour la France et en 2007/2008 pour l'Italie.</p> <p>Moyenne (somme PLTX et OVTX-a) = 36 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (LB), 61 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (UB)</p> <p>P95 = 213 $\mu\text{g.kg}^{-1}$</p> <p>Maximum = 361 $\mu\text{g.kg}^{-1}$</p> <p>% d'échantillons quantifiés = 77,5 %</p> <p>LD/LQ = 2 et 9 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pour la France*, 36 et 120 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pour l'Italie</p> <p>* valeurs corrigées 9 et 23 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (Amzil et al 2012)</p> | | | | | | | | | | |
| Milandri <i>et al.</i> (2013) | PLTX et OVTX | Oursins | Italie (Toscane), Mer Tyrrhénienne | <p>Analyse par LC-MS/MS et test hémolytique (TH). LD/LQ non précisées, 4 échantillons prélevés en juillet et août 2008 (durant une prolifération d'<i>Ostreopsis ovata</i>).</p> <p>Concentration en OVTX-a : < LQ, 87, 114 et 164 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de chair totale (pPLTX < LQ). Par TH respectivement : 5, 69, 99 $\mu\text{g eq. PLTX.kg}^{-1}$ et non dosé.</p> <p>Mortalité d'oursins, perte des aiguilles.</p> | | | | | | | | | | |
| Tibiriçá <i>et al.</i> (2019) | PLTX OVTX-a | Oursins (<i>Echinometra lucunter</i>) Concombre de mer (<i>Holothuria grisea</i>) | Brésil Sud (Archipel des Currais) | <p>n = 4, été 2017 durant une prolifération d'<i>Ostreopsis cf ovata</i>. Analyse par LC-MS/MS (par individu). LD/LQ non précisées. Pas de toxines détectées.</p> <p>n = 1, durant une prolifération d'<i>Ostreopsis cf ovata</i>, été 2017. Analyse par LC-MS/MS (par individu). LD/LQ non précisées. Pas de toxines détectées.</p> | | | | | | | | | | |

7.3.5 Poissons

Pour les poissons, qui sont généralement peu sédentaires, il est difficile de faire une relation entre la potentielle présence de toxines d'*Ostreopsis* dans ces organismes et l'abondance de cellules de ces microalgues dans les compartiments benthiques et planctoniques d'une zone déterminée.

7.3.5.1 Données internationales

La présence de toxines du groupe de la PLTX a été recherchée dans des poissons marins (*Chaetodon* spp., *Decapterus macrosoma*, *Herklotsichthys quadrimaculatus*, *Melichtys vidua*, *Scarus ovifrons*, *Sphoeroides spengler*, des poissons de récif non identifiés) et d'eau douce (*Tetraodon* spp.). En matière de données de contamination des poissons, les publications concernent souvent la zone Pacifique, avec notamment Hawaï, le Japon, l'Australie et la Micronésie, mais aussi les Caraïbes et l'Océan Indien. Les données quantitatives sont rares et, lorsqu'elles sont disponibles, leur qualité est sujette à caution en raison de la technique analytique utilisée et/ou du peu d'informations concernant les performances des dites techniques.

La PLTX a été associée à des cas d'intoxications humaines liées à la consommation de poisson (sans confirmation de la quantité de toxine ingérée). Ainsi, à Hawaï, un cas faisait suite à la consommation d'une comète fine, *Decapterus macrosoma*, importée des Philippines (identité de la PLTX confirmée par un test radioimmunologique mais sans quantification associée (Kodama *et al.*, 1989)). De même, le hareng à rayures bleues, *Herklotsichthys quadrimaculatus*, a été impliqué dans un cas d'intoxication mortel à Madagascar. Des analyses par bioessai sur souris, test hémolytique, test de cytotoxicité, test de neutralisation avec un anticorps anti-PLTX et par spectrométrie de masse MALDI TOF indiquent la présence de PLTX et/ou d'analogues (Onuma *et al.*, 1999) mais à nouveau sans quantification associée.

En matière de distribution de la PLTX dans les organes et tissus des poissons analysés par le test hémolytique, il ressort que la toxine a été retrouvée dans 74% des échantillons d'intestins et 26% des échantillons de chair prélevés sur 45 échantillons de poissons des récifs hawaïens (10 espèces herbivores et 12 espèces carnivores), mais sans quantification associée (Wachi et Hokama, 2001). Des analyses par bioessai sur souris ont montré la présence de PLTX (résultats exprimés en $US.g^{-1}$) dans le foie et la chair de six poissons perroquet à museau boutonné, *Scarus ovifrons*, pêchés en octobre 1997 dans la préfecture de Tokushima (Taniyama *et al.*, 2003), ainsi que dans les muscles et les viscères de neuf spécimens de baliste veuve à queue rose, *Melichtys vidua*, pêchés en avril 1985 dans l'atoll de Pingelap, en Micronésie (Fukui *et al.*, 1987). L'analyse par le test hémolytique des intestins de poissons papillons, *Chaetodon* spp., de l'île Lizard en Australie, a montré des concentrations en PLTX de l'ordre de $200 UH.g^{-1}$ soit l'équivalent de $80 \mu g PLTX.g^{-1}$ (Gleibs et Mebs, 1999), teneur qui doit être considérée avec prudence pour les raisons déjà évoquées. Ces mêmes auteurs rapportent la présence de PLTX à différentes concentrations dans les organes de seize des vingt-et-un poissons papillons, *Chaetodon* spp., pêchés à Santa Marta (Colombie). Parmi les organes contaminés, on retrouve les branchies, le foie, les œufs, la peau, les muscles et les intestins, ces derniers étant les plus contaminés avec des concentrations allant jusqu'à $318 UH.g^{-1}$, soit l'équivalent de $127 \mu g eq. PLTX.g^{-1}$ (Gleibs et Mebs 1999).

En plus des poissons marins, la PLTX aurait également été retrouvée dans des poissons globes dulcicoles d'espèces du genre *Tetraodon* prélevés au Bangladesh entre 1997 et 1999 (activité hémolytique retardée, inhibée par un anticorps anti-PLTX ou par l'ouabaïne). Toutefois aucune confirmation par analyse chimique de la présence effective de PLTX n'a été apportée (Taniyama *et al.*, 2001).

7.3.5.2 Données françaises- Méditerranée

Entre juillet et septembre des années 2009, 2010 et 2012, 62 échantillons d'une vingtaine d'espèces différentes de poissons ont été prélevés à Villefranche-sur-Mer et analysés dans un premier temps par le test hémolytique, beaucoup plus sensible que la méthode LC-MS/MS (LQ 1,2 vs 25 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ respectivement). Les échantillons positifs avec une concentration supérieure à 25 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (LQ du LC-MS/MS) ont ensuite fait l'objet d'une confirmation par analyse chimique en LC-MS/MS. Les toxines du groupe de la PLTX ont été quantifiées dans le tube digestif non vidé d'une quinzaine d'espèces de poissons. Dans la majorité de ces échantillons, les concentrations maximales en toxines, mesurées par le test hémolytique, étaient inférieures à 5 $\mu\text{g eq. PLTX/kg}$ de tissus mous. Toutefois, des quantités importantes ont été mesurées dans quelques échantillons de certaines espèces. Ainsi, les mulets contenaient un maximum de 392 $\mu\text{g eq. PLTX.kg}^{-1}$ de tissus mous (muscle et tube digestif non vidé) et les saupes de 230 $\mu\text{g eq. PLTX.kg}^{-1}$ de tissus mous. Le profil toxinique des échantillons était composé majoritairement d'OVTX-a (90%) et minoritairement de PLTX (10%). Dans le muscle de ces poissons, aucune des deux toxines n'a été détectée (Biré *et al.*, 2013 ; 2015 ; Brissard *et al.*, 2014).

Le Tableau XII synthétise l'ensemble des données disponibles sur la contamination des poissons par les toxines du groupe de la PLTX.

Tableau XII : Concentrations en toxines du groupe de la PLTX dans les poissons

| Référence | Toxine(s) | Espèces | Origine | Concentrations $\mu\text{g.kg}^{-1}$ poids frais |
|---|---------------------|--|--|--|
| Aligizaki <i>et al.</i> (2011) Article de revue. | PLTX eq | Baliste (<i>Melichtys vidua</i>) Perroquet (<i>Scarus ovifrons</i>) Poisson papillon (<i>Chaetodon</i> spp.) Poisson papillon (<i>Chaetodon</i> spp.) | Ouest Pacifique Japon SW Caraïbes, Sta Marta, Colombie Australie (Pacifique SW) | 31 US.g ⁻¹ (viscère) 0,27 US/g (chair) par bioessai sur souris (confirmation HPLC-UV), n=8 (poolés) 0,5 et 2,0 US.g ⁻¹ (foie et muscle) par bioessai sur souris, n=6 127 $\mu\text{g PLTX.g}^{-1}$ (viscères), 71 $\mu\text{g PLTX.g}^{-1}$ (muscle) test hémolytique et HPLC, n=8 200 UH.g ⁻¹ (viscères = 80 $\mu\text{g PLTX.g}^{-1}$) test hémolytique, n=21 |
| Biré <i>et al.</i> (2013) | isob-PLTX OVTX-a | <i>Diplodus annularis</i> , <i>Diplodus sargus</i> , <i>Mugil cephalus</i> , <i>Mullus surmuletus</i> , <i>Muraena helena</i> , <i>Sarpa salpa</i> , <i>Scorpaena porcus</i> , <i>Serranus scriba</i> , <i>Symphodus (Crenilabrus) tinca</i> | Nice et Villefranche-sur-Mer | Prélèvements effectués entre juin et septembre 2009. Analyse de première intention avec le test hémolytique (TH) et analyse de confirmation par LC-MS/MS. La LQ du TH est de 1,2 $\mu\text{g eq. PLTX./kg}^{-1}$ et les LD/LQ de la LC-MS/MS sont respectivement de 7,4 et 24,5 $\mu\text{g PLTX.kg}^{-1}$. Analyse du tube digestif et de la chair restante séparément. Puis calcul de la concentration en toxines dans la chair totale en fonction des contributions de chacune des parties analysées. 18 échantillons de 8 espèces différentes. Concentrations (en $\mu\text{g eq. PLTX.kg}^{-1}$) : <i>D. sargus</i> (1,2), <i>M. cephalus</i> (53,5), <i>S. salpa</i> (29,7). Pas de détection dans les autres espèces. Les concentrations maximales ont été détectées dans le tube digestif du mulot (<i>M. cephalus</i>) avec 392,2 $\mu\text{g eq. PLTX./kg}^{-1}$. |

| Référence | Toxine(s) | Espèces | Origine | Concentrations $\mu\text{g.kg}^{-1}$ poids frais |
|-------------------------------|-------------------------|--|---|---|
| Biré <i>et al.</i> (2015) | isob-PLTX OVTX-a | <i>Lipophrys pholis</i> , <i>Diplodus vulgaris</i> , <i>Symphodus melops</i> , <i>Symphodus tinca</i> , <i>Symphodus roissali</i> , <i>Gobiidae</i> , <i>Saurida undosquamis</i> , <i>Muraena helena</i> , <i>Coris julis</i> , <i>Thalassoma pavo</i> , <i>Symphodus ocellatus</i> , <i>Serranus scriba</i> , <i>Symphodus rostratus</i> , <i>Mullus surmuletus</i> , <i>Oblada melanura</i> , <i>Sarpa salpa</i> , <i>Scorpaena porcus</i> , <i>Chelon labrosus</i> , <i>Diplodus sargus</i> | Baie de Villefranche sur Mer (Rochambault) | <p>Prélèvements effectués entre juillet et septembre 2010</p> <p>Analyse de première intention avec le test hémolytique (TH) et analyse de confirmation par LC-MS/MS. La LQ du TH est de 1,2 $\mu\text{g eq. PLTX.kg}^{-1}$ et les LD/LQ de la LC-MS/MS sont respectivement de 7,4 et 24,5 $\mu\text{g PLTX.kg}^{-1}$.</p> <p>Utilisation de l'approche lower et upper bound (LB/UB) pour traiter les données même lorsqu'elles sont censurées (valeurs <LD ou <LQ). 75 individus.</p> <p>Sur les 19 espèces prélevées, 12 contenaient des toxines du groupe de la PLTX (OVTX-a et isob-PLTX). Les concentrations maximales en toxines sont inférieures à 5 $\mu\text{g eq. PLTX.kg}^{-1}$ de tissus mous (muscle + tube digestif) pour 9 de ces espèces. Seules 3 espèces présentent des concentrations supérieures à cette valeur (LB/UB ; en $\mu\text{g eq. PLTX/kg}^{-1}$ chair totale) <i>Lipophrys pholis</i> (8,3 / 9,3), <i>Chelon labrosus</i> (27,1 / 27,1), <i>Sarpa salpa</i> (71,8 / 72,3). Seules les saupes (<i>S. salpa</i>) juvéniles ont présenté des concentrations en toxines supérieures à la valeur guide de l'EFSA (30 $\mu\text{g PLTX + OST-D.kg}^{-1}$ chair) pour 33% des prélèvements avec une valeur moyenne sur l'ensemble des prélèvements de 19,4 et 20,1 $\mu\text{g eq. PLTX.kg}^{-1}$ chair totale (LB/UB).</p> |
| Brissard <i>et al.</i> (2014) | isob-PLTX & OVTXs (a-f) | Saupe (<i>Sarpa salpa</i>) rougets (<i>Mullus surmuletus</i>) | France Villefranche sur Mer | <p>Méthode analytique : LC-MS/MS. Extraction MeOH 90%.</p> <p>Analyses du tube digestif et du reste de la chair séparément.</p> <p>Entre juillet et septembre 2012, 25 échantillons de deux espèces ont été prélevés : saupe (n = 21) et rouget (n = 4). Accumulation de toxines uniquement dans le tube digestif de 6 des 21 saupes avec des concentrations comprises entre 19 et 152 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Aucune toxine n'a été détectée dans le muscle.</p> |
| Fukui <i>et al.</i> , (1987) | PLTX | Baliste veuf (<i>Melichthys vidua</i>) | Atoll Pingelap, Ponape, États fédérés de Micronésie | <p>9 échantillons collectés en avril 1985, muscle et viscères préparés séparément. La toxicité dans l'estomac et l'intestin a été mesurée de façon combinée pour 1 individu (21g), et combinée (toutes les viscères) pour les 8 autres (108 g viscères et 550 g de muscle). Extraction acétone, diéthyl éther, butanol. Analyse par bioessai sur souris.</p> <p>Viscères (échantillons combinés) : 3300 US Muscle (échantillons combinés) : 150 US Estomac + intestin (d'un individu) : 150 US</p> <p>1 US = quantité de toxine qui tue 1 souris (17 g) en 4h par ip</p> <p>Purification de l'extrait brut de viscères et passage sur HPLC et TLC: propriétés chromatographiques du produit similaires à celles de la PLTX.</p> |

| Référence | Toxine(s) | Espèces | Origine | Concentrations $\mu\text{g.kg}^{-1}$ poids frais |
|-------------------------------|-----------|---|---|---|
| | | | | Chez la souris, les symptômes sont similaires à ceux de la PLTX (diarrhée, cyanose, paralysie progressive). Les données sont moins claires pour ce qui est de l'extrait musculaire (la première étape de purification conduit aussi à un composé avec les mêmes propriétés chromatographiques que la PLTX. Dose – temps de survie similaire). |
| Gleibs <i>et al.</i> , (1999) | PLTX eq | <i>Chaetodon capistratus</i> ; <i>C. sedentarius</i> <i>C. aureofasciata</i> , <i>C. auriga</i> , <i>C. baronessa</i> , <i>C. citrinellus</i> , <i>C. ephippium</i> , <i>C. reinfordi</i> , <i>C. trifasciatus</i> , <i>C. vagabundus</i> | Santa Marta, Colombie, Mer des Caraïbes Lizard Island, Grande barrière de corail, Australie, Pacifique | N = 8, prélevés en 1995, test hémolytique, 1 UH correspond à 0,4 μg de PLTX. PLTX détectée dans 3/8 individus, concentrations dans les - muscles : entre 0 et 61 UH.g ⁻¹ , - intestins : entre 0 et 200 UH.g ⁻¹ , - peau : entre 0 et 51 UH.g ⁻¹ , - foie : entre 0 et 190 UH.g ⁻¹ , N = 21, prélevés en 1995, PLTX détectée dans 16/21 individus, concentrations dans les - muscles : entre 0 et 178 UH.g ⁻¹ , - intestins : entre 0 et 318 UH.g ⁻¹ , - peau : entre 0 et 141 UH.g ⁻¹ , - foie : entre 37 et 73 UH.g ⁻¹ , - oeufs : entre 13 et 106 UH.g ⁻¹ . |
| Onuma <i>et al.</i> (1999) | PLTX eq | Harengs à bande bleue (<i>Herklotsichthys quadrimaculatus</i>) | Madagascar | Madagascar : janvier 1994, 1 intoxication humaine mortelle avec PLTX attribuée à <i>Ostreopsis siamensis</i> via la consommation de harengs à bande bleue. Bioessai sur souris : 0,45 μg eq. PLTX par poisson (tête et œsophage) Test hémolytique : 0,02 μg par poisson (tête et œsophage) |

En plus des informations de la littérature scientifique, l'Ifremer a étudié durant l'été 2009 la contamination de poissons provenant de la pêche professionnelle et de la ferme aquacole (Pommègues, large de Marseille), suite à la prolifération d'*Ostreopsis cf. ovata* observée en août 2006 en région PACA (Provence-Alpes-Côte d'Azur). La recherche de toxines du groupe de la PLTX a été réalisée par analyse chimique en LC-MS/MS dans les viscères et la chair restante, séparément. À défaut d'étalon, la concentration de l'OVTX-a a été estimée en utilisant un étalon de la PLTX. Les limites de détection/quantification n'ont pas été déterminées pour les poissons. Pour rappel elles étaient pour les moules de 9 et 23 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ et pour les oursins de 10 et 25 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

Dix échantillons de huit espèces différentes ont été analysés : rascasse (n=2), mulot (n=2), sar, gobie, loup (*Dicentrarchus labrax*), saupe (*Sarpa salpa*), oblade (*Oblada melanura*). Seule l'OVTX-a a été quantifiée dans les viscères d'un mulot (52 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). Les toxines recherchées n'ont été détectées dans aucun échantillon de chair.

7.3.6 Gastéropodes

7.3.6.1 Données internationales

Lors du suivi des niveaux de contamination en OVTX et isob-PLTX de moules prélevées en mer Tyrrhénienne en 2008 (cf paragraphe 7.3.1.1.), Milandri *et al.* (2013) ont noté des mortalités de patelles. Les gastéropodes n'ont pas pu être analysés (coquilles vides).

7.3.6.2 Données françaises - Méditerranée

Durant les étés 2009 et 2010, les analyses de onze échantillons de patelle et de 51 échantillons de murex ont montré la présence de toxines du groupe de la PLTX (isob-PLTX, OVTX-a) dans de nombreux échantillons des deux espèces. Les concentrations maximales étaient de 12,7 µg eq PLTX.kg⁻¹ de chair totale de patelle et de 34 µg eq. PLTX.kg⁻¹ chair totale de murex en 2009. Les échantillons de 2010 montraient des concentrations maximales de 6,6 et 40,4 µg eq. PLTX.kg⁻¹ de chair totale des patelles et des murex, respectivement (Biré *et al.*, 2013 ; 2015). Par contre, l'analyse en LC-MS/MS de dix échantillons de murex, prélevés en juillet 2012, n'a permis de détecter aucune toxine du groupe de la PLTX (Brissard *et al.*, 2014).

Le Tableau XIII synthétise l'ensemble des données disponibles sur la contamination des holothuries et des gastéropodes par les toxines du groupe de la PLTX.

Tableau XIII : Concentrations en toxines du groupe de la PLTX dans des holothuries et des gastéropodes

| Référence | Toxine(s) | Espèces | Origine | Concentrations µg.kg ⁻¹ poids frais |
|---------------------------|--------------------------------|--|---|--|
| Biré <i>et al.</i> (2013) | isob-PLTX PLTX eq | Gastéropodes : <i>Patella</i> spp., <i>Stramonita</i> <i>haemastoma</i> | Nice et Villefranche sur Mer | Prélèvements effectués entre juin et septembre 2009. Analyse de première intention avec le test hémolytique (TH) et analyse de confirmation par LC-MS/MS. La LQ du TH est de 1,2 µg eq. PLTX.kg ⁻¹ et les LD/LQ de la LC-MS/MS sont respectivement de 7,4 et 24,5 µg PLTX.kg ⁻¹ . Analyse de la chair totale de 3 échantillons de patelle, 23 échantillons de murex. <i>Patella</i> spp. (12,7 en µg eq. PLTX.kg ⁻¹), <i>S. haemastoma</i> (34,1 en µg eq. PLTX.kg ⁻¹) |
| Biré <i>et al.</i> (2015) | isob-PLTX PLTX eq OVTX-a | Gastéropodes : <i>Hexaplex</i> <i>trunculus</i> , <i>Patella</i> spp | Baie de Villefranche sur Mer (Rochambault) | Prélèvements effectués entre juillet et septembre 2010 Analyse de première intention avec le test hémolytique (TH) et analyse de confirmation par LC-MS/MS. La LQ du TH est de 1,2 µg eq. PLTX.kg ⁻¹ et les LD/LQ de la LC-MS/MS sont respectivement de 7,4 et 24,5 µg PLTX.kg ⁻¹ . Utilisation de l'approche lower et upper bound (LB/UB) pour traiter les données même lorsqu'elles sont censurées (valeurs <LD ou <LQ). Analyse de 8 individus de patelle et 8 de murex Les concentrations maximales en toxines sont comprises entre 6,6 (<i>Patella</i> spp.) et 40,4 µg eq. PLTX.kg ⁻¹ chair totale (<i>H. trunculus</i>). 13% des prélèvements de murex <i>H. trunculus</i> sont au-dessus de la valeur guide de l'EFSA, néanmoins la moyenne de l'ensemble des échantillons de murex est de 7,3 / 7,7 µg eq. PLTX.kg ⁻¹ chair totale (LB/UB). |

| Référence | Toxine(s) | Espèces | Origine | Concentrations $\mu\text{g.kg}^{-1}$ poids frais |
|-------------------------------|--------------------------|--|--------------------------------|--|
| Brissard <i>et al.</i> (2014) | isob-PLTX OVTXs (a-f) | Gastéropodes : <i>Stramonita haemastoma</i> | France Villefranche sur Mer | Prélèvements en juillet 2012 Méthode analytique : LC-MS/MS. Extraction MeOH 90%. Pas de détection de toxines dans la chair totale de 10 individus de murex. LD/LQ non précisées. |

En plus des informations de la littérature scientifique, l'Ifremer a étudié la contamination de gastéropodes durant l'été 2009, suite à la prolifération d'*Ostreopsis cf. ovata* observée en août 2006 en région PACA (Provence-Alpes-Côte d'Azur). La recherche de toxines du groupe de la PLTX a été réalisée par analyse chimique en LC-MS/MS dans la chair totale. À défaut d'étalon, la concentration de l'OVTX-a a été estimée en utilisant un étalon de la PLTX. Les limites de détection/quantification n'ont pas été déterminées pour les gastéropodes (elles étaient pour les moules de 9 et 23 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ et pour les oursins de 10 et 25 $\mu\text{g.kg}^{-1}$).

Deux échantillons de patelle et un échantillon de murex ont été analysés. Seule l'OVTX-a a été quantifiée dans l'échantillon de murex (67 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). La PLTX n'a été détectée dans aucun échantillon et aucune des deux toxines n'a été détectée dans les échantillons de patelle.

7.4 Points à retenir

- Les abondances maximales d'*Ostreopsis* dans le compartiment benthique sont très élevées en zones tempérées, notamment sur la côte méditerranéenne française ainsi que sur la côte basque (de quelques centaines de milliers à des millions de cellules par gramme de poids frais de macroalgue). Ces abondances cellulaires dans le compartiment benthique sont généralement plus faibles dans les zones tropicales (le plus souvent quelques milliers ou dizaines de milliers de cellules par gramme de poids frais de macroalgue).
- L'estimation de l'abondance des cellules dans le compartiment benthique est exprimée en quantité de cellule par gramme de poids frais de macrophytes et ne prend pas en compte à ce jour la surface des fonds côtiers colonisés ;
- Les OVTX se distribuent dans trois compartiments : dans les cellules d'*Ostreopsis* (toxines intracellulaires), solubilisées dans la colonne d'eau (toxines extracellulaire), et éventuellement associées au mucus ;
- Les méthodologies d'extraction des OVTX extracellulaires et du mucus ne sont pas encore optimisées ; ainsi aucune donnée de concentration n'existe pour ces compartiments en milieu naturel.
- Les concentrations intracellulaires en OVTX sont très variables d'une zone géographique à l'autre, avec des minima ($\sim 10^{-3}$ pg.cell⁻¹) sur les côtes Atlantiques (Maroc, Pays Basque) et un maximum (75 pg.cell⁻¹) en Méditerranée (mer Adriatique).
- Certains facteurs biotiques et abiotiques, comme la nature du substrat, la phase de croissance, la présence de compétiteurs et/ou la température, semblent contribuer à cette variabilité ;
- les OVTX peuvent être transférées vers l'atmosphère ;
- L'enrichissement des aérosols en OVTX serait en partie dépendant de l'abondance cellulaire d'*Ostreopsis* dans la couche de surface de la colonne d'eau, mais surtout des

conditions météorologiques (vent). Les mécanismes de cette aérosolisation sont encore inconnus.

- L'accumulation des toxines du groupe de la PLTX, produites par *Ostreopsis*, dans les produits de la mer a été observée dans de nombreux pays, en particulier sur le pourtour méditerranéen.
- L'OVTX-a est majoritaire puisqu'elle représente environ 70% du profil toxinique, suivi par l'OVTX-b (20-30%), puis par les OVTX-c et -e (env. 5%).
- Les oursins et les moules sont ceux qui accumulent le plus de toxines, avec une variabilité importante entre les individus.
- Dans un grand nombre d'études internationales, les techniques analytiques utilisées ne permettent ni d'identifier de manière non équivoque, ni de quantifier les toxines du groupe de la PLTX.
- De rares cas d'intoxication humaine, aux Philippines et à Madagascar, ont été associés à la consommation de produits de la mer contaminés par *Ostreopsis*, dont des crabes et des poissons, cependant les méthodes analytiques utilisées (bioessais) ne permettent pas de les attribuer de manière certaine à la présence de toxines du groupe de la PLTX produites par *Ostreopsis*.
- Le GT estime qu'il n'est pas possible d'exclure le risque d'exposition par voie orale lié à la consommation de produits de la mer contaminés par des toxines du groupe de la PLTX, surtout pour les organismes consommés non éviscérés. Les voies d'exposition principales restent toutefois l'inhalation d'aérosols et le contact avec l'eau de mer.

8 Proposition de valeur guide en toxines d'*Ostreopsis* dans les produits de la mer

Compte tenu de l'absence de connaissance sur le ou les composés à l'origine des intoxications humaines signalées lors des épisodes de prolifération d'*Ostreopsis* sur la côte basque, le GT « *Ostreopsis* » ne propose pas de valeur guide pour les toxines produites par *Ostreopsis* dans l'eau ou dans les aérosols.

Pour les coquillages, à partir de la valeur toxicologique de référence aiguë par voie orale de 0,08 µg PLTX.kg⁻¹ pc, d'une taille de portion par défaut de 400 g de coquillages (EFSA 2010)³⁶ et d'un poids corporel par défaut de 70 kg, la concentration à ne pas dépasser dans les coquillages serait de 14 µg PLTX.kg⁻¹ de chair totale (arrondie à 15 µg PLTX.kg⁻¹).

Le GT « *Ostreopsis* » et le CES ERCA notent que la portion par défaut de 400 g est compatible avec les forts percentiles de consommation de coquillages dans d'autres études menées par l'Anses (CALIPSO, CONSOMER). D'autre part, le poids corporel par défaut de 70 kg est protecteur au regard du poids moyen de la population française adulte de l'étude INCA3 (de 73,9 kg, Anses, 2017)³⁷.

Le GT « *Ostreopsis* » et le CES ERCA **recommandent donc une valeur guide de 15 µg eq. PLTX.kg⁻¹ de chair totale dans les coquillages, pour la somme PLTX + OVTX + OST-D.**

Pour les poissons, les toxines du groupe de la PLTX s'accumulent préférentiellement dans les viscères et très peu dans les muscles. Le GT recommande donc que **les poissons pêchés dans une zone impactée par des proliférations d'*Ostreopsis* soient éviscérés avant consommation et avant congélation. Les petits poissons ne doivent pas être consommés entiers.**

Pour les oursins, les toxines du groupe de la PLTX s'accumulent également préférentiellement dans les viscères, qui ne sont normalement pas consommées. **Il est important d'informer les consommateurs d'oursins de ne pas consommer les viscères et de respecter l'interdiction de pêche estivale lorsqu'elle existe.**

En l'état actuel des connaissances, le GT ne recommande pas de valeur guide pour les toxines du groupe de la PLTX pour les autres produits de la mer que les coquillages. Le GT attire néanmoins l'attention sur le besoin de données de contamination en France pour juger de l'opportunité de proposer une valeur guide à l'avenir.

³⁶EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Statement on further elaboration of the consumption figure of 400 g shellfish meat on the basis of new consumption data. EFSA Journal 2010; 8(8):1706. [20 pp.]. doi:10.2903/j.efsa.2010.1706.

³⁷Anses 2017. Étude individuelle nationale des consommations alimentaires 3 (INCA 3). Avis de l'Anses et Rapport d'expertise collective, Juin 2017. Saisine n° 2014-SA-0234, 566 p.

8.1 Points à retenir

En cas de dépassement de la valeur guide en toxines d'*Ostreopsis* de 15 µg eq. PLTX.kg⁻¹ de chair totale dans les coquillages, pour la somme PLTX + OVTX + OST-D, le GT « *Ostreopsis* » recommande :

- d'acquérir des données complémentaires de contamination dans les coquillages dans la zone impactée par la prolifération pour l'espèce pour laquelle le dépassement a été observé et pour d'autres espèces exploitées et/ou consommées sur la zone ;
- d'acquérir des données de contamination dans d'autres produits de la mer présents dans la zone impactée par la prolifération (crustacés, céphalopodes, poissons, oursins, algues destinées à la consommation humaine) ; en l'attente de ces résultats il est recommandé de ne pas les consommer ;
- la non consommation des coquillages issus de la zone impactée par la prolifération (récolte professionnelle et de loisir) ;
- l'éviscération des poissons avant consommation et congélation pêchés dans les zones contaminées ;
- d'informer les consommateurs d'oursins de ne pas consommer les viscères et de respecter l'interdiction de pêche estivale lorsqu'elle existe ;
- de ne pas récolter les macoralgues dans la zone impactée par une prolifération d'*Ostreopsis* pendant la durée de l'épisode ;
- d'informer les professionnels de santé afin de permettre l'identification de potentiels cas d'intoxication alimentaire liés aux toxines d'*Ostreopsis*.

9 Stratégies d'échantillonnage, techniques de prélèvements et de quantification d'*Ostreopsis* et des toxines associées

Ce chapitre liste les méthodes et pratiques existantes concernant les stratégies d'échantillonnage, de prélèvement, d'identification, de quantification des cellules d'*Ostreopsis* spp. et des toxines associées, avec leurs avantages et limites. Aucune de ces méthodes et techniques n'est normalisée à ce jour. De plus, les méthodes présentées ont des objectifs différents, puisque certaines sont appliquées dans le cadre de travaux de recherche et d'autres dans le cadre du contrôle sanitaire des produits de la mer ou des eaux de baignade.

Les données de ce chapitre sont issues de l'analyse de différentes stratégies d'échantillonnage spécifiques à *Ostreopsis* (ou à d'autres dinoflagellés benthiques toxiques) et des méthodes d'analyses développées par plusieurs équipes de recherche européennes (Cohu *et al.*, 2013 ; Jauzein *et al.*, 2018 ; Gemin *et al.*, 2020) et hors Europe (Nascimento *et al.*, 2012 ; Gomez *et al.*, 2017 ; Rhodes *et al.*, 2000 ; Shears et Ross, 2009), ainsi que de l'expérience acquise par l'Ifremer et les structures en charge des suivis de la qualité des eaux de baignades suite aux épisodes de proliférations observées en France depuis les années 2000 sur la côte méditerranéenne et plus récemment sur la côte basque.

9.1 Stratégie d'échantillonnage

Les stratégies d'échantillonnage sont définies en fonction des contextes locaux et des finalités d'utilisation des données obtenues (suivis sanitaires, études scientifiques). Ces stratégies concernent à la fois le choix des zones qui font l'objet d'une surveillance ou d'une étude, la matrice échantillonnée (eau et/ou organismes marins tels que les macroalgues et les produits de la mer), les méthodologies de prélèvement des échantillons et la temporalité de ces prélèvements.

Zones faisant l'objet d'un suivi des abondances d'*Ostreopsis*

Il est généralement admis que les proliférations d'*Ostreopsis* sont récurrentes sur les mêmes sites d'une année à l'autre (Gémin *et al.*, 2020b ; Drouet *et al.*, 2022 ; Berdalet *et al.*, 2022), ce qui conditionne, pour une part importante, le choix des zones devant faire l'objet d'une surveillance

De ce fait, dans le cadre des projets de recherche visant à suivre la dynamique des populations d'*Ostreopsis* et/ou les concentrations en toxines dans l'eau réalisés en Méditerranée, les zones d'échantillonnage d'*Ostreopsis* ont été définies, soit à partir d'une recherche exploratoire initiale de sites favorables aux proliférations d'*Ostreopsis*, soit sur des sites où des cas groupés d'intoxications humaines d'origine non alimentaire ont été signalés aux services de santé. C'est le cas du site de Gênes en Italie (2005-2006), de la plage du Larvotto à Monaco (2008-2022), des sites Rochambeau dans la baie de Villefranche-sur-Mer et du Morgiret (archipel du Frioul, Marseille) en France (2012-2022), ainsi que de la plage de Llanerres en Espagne (2004-2022). Ces différents sites ont fait ou font encore l'objet d'études scientifiques. Il s'agit aussi bien de zones calmes (baies) que de zones agitées (cap).

À ce jour, aucune zone ne fait l'objet d'une surveillance régulière du contenu toxinique des aérosols. Seuls quelques projets de recherche ont eu pour objectif de mesurer, de façon ponctuelle, les OVTX dans l'air ambiant. Ces mesures se font alors en période de prolifération d'*Ostreopsis*, au niveau de sites sujets à ces proliférations récurrentes.

Concernant les activités de recherche relatives à la surveillance de la contamination des organismes marins par les toxines d'*Ostreopsis* (Amzil *et al.*, 2012 ; Biré *et al.*, 2013 et 2015 ; Brissard *et al.*, 2014), des zones d'échantillonnage ont été choisies dans les zones connues pour héberger des proliférations d'*Ostreopsis*. Ce choix reposait sur l'hypothèse que les organismes sessiles ou à faible mobilité (spongiaires, gastéropodes, échinodermes, mollusques) ont une forte probabilité d'avoir des interactions importantes (par contact, filtration ou ingestion) avec les microalgues toxiques dans les zones où elles prolifèrent. Dans le cas d'organismes à plus grande mobilité (céphalopodes, poissons), ces interactions sont probablement plus aléatoires, plus ponctuelles et moins prolongées. Ainsi, il est possible mais peu probable que des animaux à forte mobilité puissent contenir des toxines d'*Ostreopsis*, dans des zones assez éloignées des sites de prolifération de la microalgue toxique.

Dans le cadre du contrôle sanitaire des eaux de baignade françaises, plusieurs sites du pourtour méditerranéen dont le profil est favorable aux proliférations d'*Ostreopsis* (faible profondeur, présence de substrat rocheux avec des macroalgues) et qui présentent de fortes fréquentations pour des activités de baignade et/ou nautiques ont été retenus comme sites sentinelles pour suivre l'évolution des proliférations d'*Ostreopsis* au cours des saisons estivales. Sur la côte basque française, la surveillance d'*Ostreopsis* en 2022 a été réalisée sur quatre sites où des intoxications humaines par inhalation liées aux proliférations d'*Ostreopsis* avaient été signalées durant la saison estivale de 2021.

Le suivi d'*Ostreopsis* est également réalisé dans le cadre du REPHY (Réseau d'observation et de surveillance du Phytoplancton et de l'hydrologie dans les eaux littorales). Ce réseau de surveillance du phytoplancton est déployé sur tout le littoral français métropolitain dans les zones conchylicoles et les zones de pêche professionnelle de coquillages. Dans le cadre d'EMERGTOX, réseau de veille d'émergence des toxines marines dans les coquillages, une recherche des PLTX et OVTX-a est aussi réalisée dans des coquillages prélevés sur onze sites répartis le long du littoral métropolitain (Amzil, 2021).

Compartiments échantillonnés

Dans le cadre des projets de recherche visant à suivre la dynamique des populations d'*Ostreopsis* et/ou les concentrations en toxines, les cellules d'*Ostreopsis* sont généralement prélevées simultanément dans le compartiment benthique (sur les macrophytes qui se développent sur les fonds marins) et dans le compartiment planctonique (colonne d'eau). Par ailleurs, des prélèvements additionnels de fleurs d'eau (zones de très fortes accumulations de cellules d'*Ostreopsis* en surface de la mer) sont parfois réalisés lorsque de telles accumulations sont présentes sur les sites d'études. La présence de grandes quantités de fleurs d'eau à *Ostreopsis* est synonyme de proliférations importantes de ces microalgues, parfois loin de la zone d'accumulation en surface. Il est cependant impératif de vérifier au microscope qu'il s'agit bien d'agrégats de cellules d'*Ostreopsis*, les fleurs pouvant être formées par de nombreuses autres espèces de microalgues. Enfin, les toxines produites par *Ostreopsis* peuvent faire l'objet d'un suivi dans les aérosols formés sur les sites où des proliférations de cette microalgue ont été identifiées.

Les organismes marins récoltés dans le cadre de projets de recherche sont variés et comprennent des mollusques (bivalves, gastéropodes, céphalopodes), des crustacés, des poissons. Le détail des espèces qui ont pu être étudiées jusqu'à présent, est présenté dans le chapitre « contamination ».

Sur la côte basque, au cours de l'été 2022 dans le cadre d'un suivi environnemental réalisé par l'Ifremer, des prélèvements dans les compartiments benthique et planctonique ont été réalisés pour la recherche d'*Ostreopsis*. Dans le cadre du contrôle sanitaire des eaux de baignade françaises, actuellement seuls des prélèvements d'*Ostreopsis* dans le compartiment planctonique en sub-surface (entre 0 et 1m de profondeur) sont réalisés. La réglementation en vigueur ^[1] stipule, qu'en cas d'observation de fleurs d'eau, ces dernières doivent être prélevées avec de l'eau de surface environnante pour analyse .

Enfin, dans le cadre du REPHY, seuls des prélèvements d'eau sont réalisés dans le compartiment planctonique en sub-surface (entre 0 et 1 m de profondeur) pour l'étude de la flore totale (mesure de l'abondance de toutes les espèces de microalgues) ou de la flore toxique (uniquement mesure de l'abondance des espèces de microalgues toxiques) (REPHY, 2023).

Nombre d'échantillons prélevés

Dans le cadre de projets de recherche, le nombre d'échantillons prélevés est variable selon les objectifs poursuivis. Pour déterminer l'abondance d'*Ostreopsis* dans une zone donnée (par exemple une plage), les membres du Laboratoire d'Océanographie de Villefranche-sur-Mer réalisent trois prélèvements dans le compartiment planctonique et trois prélèvements de substrats benthiques, chacun distant d'environ 10 m (Jauzein *et al.*, 2018). Les membres de l'Institut des sciences de la mer de Barcelone, effectuent des prélèvements composites dans le compartiment benthique, en mélangeant trois prélèvements réalisés à environ 10 m de distance (Berdalet, communication personnelle). Sur la côte basque, dans le cadre du suivi environnemental réalisé par l'Ifremer, des prélèvements uniques ont été réalisés durant l'été 2022 à marée basse sur des sites avec un fort enrochement, dans les compartiments benthique et planctonique. Les prélèvements à marée basse permettent ainsi d'atteindre la ceinture algale en fonction du coefficient de marée.

Dans le cadre du contrôle sanitaire des eaux de baignade françaises, la réglementation en vigueur indique qu'un seul prélèvement d'eau dans le compartiment planctonique doit être réalisé, sans indication sur les conditions de marée lors du prélèvement. Un prélèvement de fleurs d'eau doit également être effectué en cas d'observation de ces dernières.

En ce qui concerne le suivi sanitaire effectué à la plage du Larvotto (Principauté de Monaco), à chaque date de contrôle, plus d'une douzaine d'échantillons sont prélevés dans les compartiments benthique et/ou planctonique répartis sur toute la plage (Cohu *et al.*, 2011 ; Drouet *et al.*, 2022) afin de prendre en compte la très grande variabilité spatiale dans la distribution des cellules d'*Ostreopsis*.

De nombreux travaux de recherche ayant pour but d'identifier et de quantifier les toxines d'*Ostreopsis* dans les organismes marins sont fondés sur le prélèvement de quelques individus d'une même espèce dans la zone de développement d'*Ostreopsis*. Ils sont analysés

de manière isolée ou dans un échantillon composite regroupant plusieurs individus d'une même espèce (Amzil *et al.*, 2012 ; Biré *et al.*, 2013 et 2015 ; Brissard *et al.*, 2014).

Périodes de l'année, fréquences et temporalité des échantillonnages

Périodes :

Dans le cadre de projets de recherche, les concentrations d'*Ostreopsis* dans les compartiments benthique et planctonique sont suivies sur des périodes de temps assez longues, de la fin du printemps jusqu'au début de l'automne, afin de pouvoir disposer de l'évolution complète des proliférations au cours du temps. Concernant les organismes marins pouvant contenir des toxines d'*Ostreopsis*, ils sont généralement prélevés lorsque les abondances cellulaires augmentent de manière significative, puis lorsqu'elles stagnent et enfin, lorsqu'elles ont décliné significativement des proliférations des microalgues. Les contrôles sanitaires des eaux de baignade françaises ont lieu pendant la saison balnéaire, généralement du 15 juin au 15 septembre.

Dans le cadre du REPHY, l'échantillonnage est effectué régulièrement tout au long de l'année sur les différents sites du réseau (Cahier de prescription REPHY, 2023).

Fréquence :

Un autre paramètre important dans le suivi des populations d'*Ostreopsis* et de leurs toxines, concerne la fréquence des prélèvements.

Dans le cadre de projets de recherche, la fréquence des prélèvements dépend des objectifs des études. Si l'objectif est d'étudier la variation journalière dans la distribution des abondances d'*Ostreopsis* dans les compartiment benthique et planctonique, il est conseillé de réaliser plusieurs prélèvements par jour (par exemple toutes les quatre heures dans Pavaux *et al.*, 2021). Dans le cadre du suivi environnemental mené par l'Ifremer sur la côte basque durant l'été 2022, et afin d'étudier le rôle de la marée, les concentrations d'*Ostreopsis* dans les eaux de baignade ont été évaluées en trois points de la plage d'Erromardie et les échantillonnages (y compris sur les macroalgues à basse mer) ont été effectués toutes les deux heures pendant deux cycles de marée, soit 48 heures.

Dans la majorité des études scientifiques où l'objectif principal est de déterminer la dynamique saisonnière des proliférations, la fréquence des prélèvements est très souvent mensuelle avant et après la période estivale, hebdomadaire pendant la période estivale, et de deux à trois fois par semaine durant un épisode de prolifération.

Les prélèvements de produits de la mer sont le plus souvent réalisés à un rythme hebdomadaire lors de la période de prolifération (Amzil *et al.*, 2012 ; Biré *et al.*, 2013 et 2015 ; Brissard *et al.*, 2014).

Dans le cadre du contrôle sanitaire des eaux de baignade en été³⁸, selon les réglementations en vigueur, les prélèvements sont bimensuels en France sur la côte méditerranéenne, hebdomadaires dans la Principauté de Monaco, et bimensuels à hebdomadaires sur la côte basque française dans le cadre du suivi environnemental mis en place en 2022. Le nombre

³⁸ Note de service DGS/EA3/EA4 n°2010-238 du 30 juin 2010 relative à la surveillance sanitaire et environnementale et aux modalités de gestion des risques sanitaires pour la saison balnéaire 2010, liés à la présence de la microalgue toxique *Ostreopsis* spp. dans les eaux de baignade en méditerranée et à la contamination par ses toxiques des produits de la mer issus de la pêche de loisirs.

de prélèvements peut être modifié (fréquence plus élevée) à la demande des gestionnaires de la qualité des eaux littorales, en cas de dépassement des seuils en cellules fixés par les autorités sanitaires.

Dans le cadre du REPHY, les prélèvements sont réalisés toute l'année à une fréquence bimensuelle ou hebdomadaire qui diffère selon la façade et le type de masse d'eau ainsi que du paramètre analysé (Cahier de prescription REPHY, 2023). Cette fréquence est aussi adaptée lors des périodes définies à risque phytotoxique ou encore pendant la période de récolte des coquillages dans le secteur d'échantillonnage (Cahier de prescription REPHY, 2023).

Horaire d'échantillonnage

Sachant que la répartition des cellules entre les compartiments benthique et planctonique suit un cycle journalier, il est important de s'intéresser à l'heure à laquelle sont réalisés les prélèvements. Dans le cadre du contrôle sanitaire des eaux de baignade en France et en Italie, ces prélèvements sont presque toujours effectués le matin, pour des raisons pratiques et logistiques (peu de trafic sur les routes et peu de personnes sur les plages). Or, les travaux sur l'écologie d'*Ostreopsis* ont montré que sa concentration maximale dans la colonne d'eau est plutôt atteinte en fin d'après-midi (cf. chapitre écologie) ; les prélèvements matinaux du contrôle sanitaire pourraient donc entraîner une sous-estimation des concentrations d'*Ostreopsis*.

9.2 Méthodes de prélèvements et d'analyses des échantillons

Différents outils et méthodes de prélèvements existent et leur choix est conditionné par l'objectif des analyses envisagées (identification des microalgues, quantification des microalgues, quantification des toxines dans les cellules de microalgues, dans l'eau, dans les aérosols ou dans les produits de la mer).

9.2.1 Prélèvement, transport et conservation des échantillons planctoniques et des fleurs d'eau

Dans le cadre de projets de recherche réalisés en Méditerranée, l'eau est récoltée dans un flacon en plastique (polyéthylène ou équivalent) à large ouverture à une profondeur comprise entre 30 et 50 cm, en ouvrant, remplissant et fermant le flacon à cette même profondeur (Jauzein *et al.*, 2018). Les flacons ont une contenance de 250 mL à 1 L, en fonction du nombre d'analyses à réaliser (abondances cellulaires d'*Ostreopsis*, analyse complète de la communauté microplanctonique complète, analyses des toxines, *etc.*). Les prélèvements sont placés dans un contenant isotherme pour le transport jusqu'au laboratoire. Les fleurs d'eau peuvent être prélevées avec des flacons en plastique ou en verre à large ouverture. Elles sont également conservées dans un contenant isotherme jusqu'au laboratoire.

Dans le cadre du contrôle sanitaire des eaux de baignade, l'agent préleveur récolte de l'eau en sub-surface dans un flacon de 250 mL placé au bout d'une perche, soit depuis un bateau, soit directement depuis le bord de mer. Le prélèvement est transporté dans un contenant isotherme jusqu'au laboratoire.

Dans le cadre du REPHY, les échantillons d'eau sont prélevés à l'aide d'une bouteille de prélèvement verticale à messenger (type Niskin) depuis un bateau ou un ponton. Les prélèvements sont effectués à la profondeur définie par la stratégie du REPHY en fonction des caractéristiques du site (souvent en sub-surface, quelquefois dans le premier mètre de profondeur ou dans la zone profonde près du fond). La bouteille de prélèvement est alors fermée grâce à un messenger, qui est un lest glissant sur le câble qui porte la bouteille. Ce lest vient percuter un système permettant la fermeture de la bouteille à la profondeur désirée. Une fois la bouteille ramenée sur le bateau ou à terre, un litre d'eau est récupéré, versé dans un flacon en plastique (polyéthylène ou équivalent) et transporté dans un contenant isotherme jusqu'au laboratoire (Cahier de prescription REPHY, 2023).

Pour tous ces prélèvements, les échantillons destinés à l'identification des cellules et à leur dénombrement sont conservés en ajoutant du lugol ou du lugol acide (1 à 2% vol/vol final). Les échantillons lugolés sont conservés à température ambiante si le dénombrement est réalisé rapidement (dans les 48h). Sinon, ils sont conservés au réfrigérateur, mais doivent être analysés dans les six mois (cf. les recommandations du PHYTOBS (Service National d'Observation du microphytoplancton, suivis Ifremer/CNRS labélisés dans le cadre de l'Infrastructure de Recherche littorale et côtière (ILICO).

Les échantillons destinés à la quantification des toxines ne sont pas lugolés et sont maintenus au frais (en général dans un contenant isotherme entre 5-10 °C). Ils sont traités le plus rapidement possible pour éviter la lyse des cellules et/ou le broutage par le zooplancton.

9.2.2 Prélèvement, transport et conservation des échantillons benthiques

Échantillonnage des cellules d'*Ostreopsis* sur macrophytes

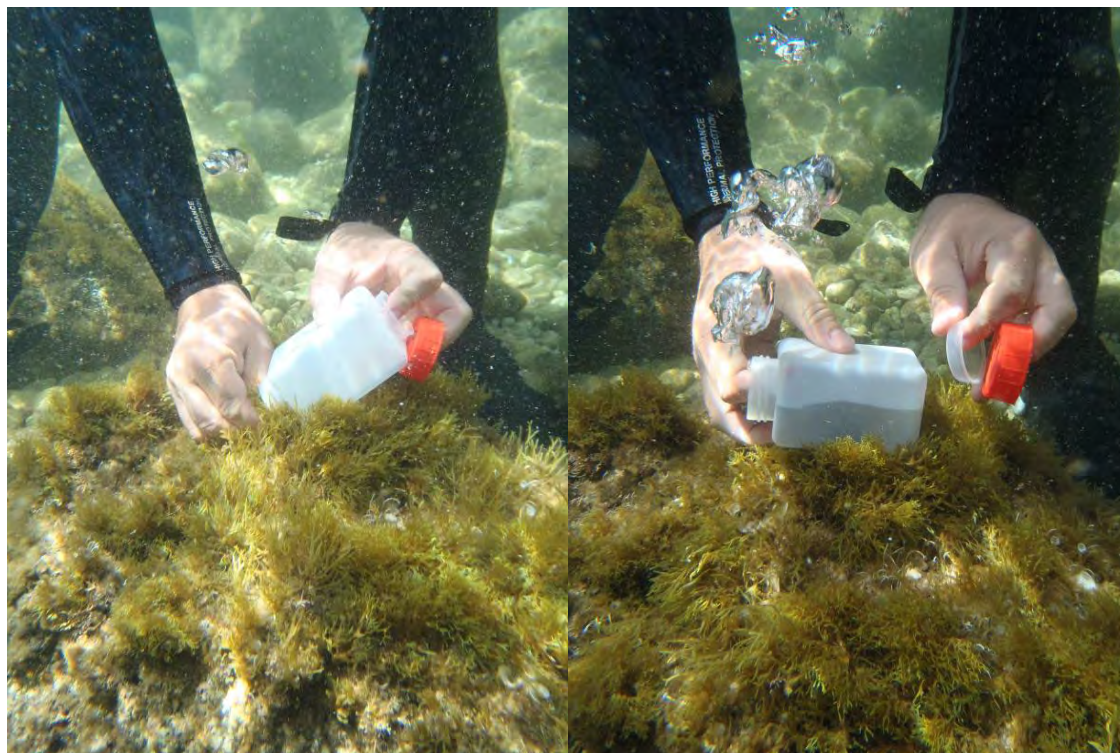


Figure 34 : Prélèvement de macroalgues en Méditerranée, à 50 cm de profondeur. Il est important d'ouvrir et de fermer le flacon à la profondeur de prélèvement. Ce prélèvement a été réalisé hors période de prolifération d'*Ostreopsis* ce qui explique l'absence de port de gants. Photo Lab. d'Océanographie de Villefranche

L'échantillonnage des cellules d'*Ostreopsis* dans le compartiment benthique est généralement réalisé à partir de prélèvements de macrophytes (macroalgues et phanérogames marines) sur lesquels elles se développent (Figure 34).

Les macrophytes choisis sont généralement le genre ou l'espèce le plus représenté dans la zone étudiée. En Méditerranée, comme l'abondance d'*Ostreopsis* dans le compartiment benthique varie en fonction de la profondeur (Cohu et Lemée, 2012), les macrophytes sont le plus souvent prélevés à 0,5 m de profondeur, profondeur à laquelle les cellules *Ostreopsis* sont les plus abondantes (cf. chapitre Ecologie). Les macrophytes sont récoltés, avec leur eau environnante, à l'aide d'un flacon en plastique à large ouverture (de 250 mL à 1 L) ou d'un sac plastique (avec fermeture à glissière), le plus délicatement possible pour éviter de décrocher les *Ostreopsis* de leur substrat (Mangialajo *et al.*, 2011 ; Cohu *et al.*, 2013). Le prélèvement est effectué en ouvrant, remplissant et fermant le flacon (ou le sac) à cette même profondeur. Il a été montré que la quantité de macrophytes prélevée influence les résultats : le fait de prélever trop de macrophytes conduit à une sous-estimation de la quantité d'*Ostreopsis.g⁻¹ PF* (Jauzein *et al.*, 2018). Il est donc préférable de prélever entre 5 et 10 g de macrophytes pour les flacons de 250 mL et 20 à 40 g pour un flacon d'1 litre. C'est uniquement l'expérience du préleveur qui permet de récolter la bonne quantité de macrophytes.

Dans tous les cas, les échantillons sont transportés dans un contenant isotherme, pour maintenir leur température constante jusqu'à leur analyse au laboratoire, afin d'éviter toute surchauffe des échantillons qui entraînerait la lyse des cellules. Les échantillons (eau + macrophytes) peuvent servir à plusieurs analyses :

- Si l'objectif est uniquement de dénombrer les cellules d'*Ostreopsis* par microscopie optique, l'échantillon est fixé avec une solution de lugol ou de lugol acide (1 à 2% vol/vol final). Au laboratoire, la masse de macrophytes fraîche sera pesée et après comptage des cellules, l'abondance sera exprimée en nombre de cellules d'*Ostreopsis* par gramme de poids frais de macrophytes (cell.g⁻¹ PF).
- Si l'échantillon doit servir à d'autres analyses (quantification de toxines, analyses biochimiques ou de biologie moléculaire), il n'est pas fixé au lugol et est traité selon le protocole associé à chaque analyse.

Dans un contexte de conservation des milieux côtiers et des communautés de macrophytes, l'aspect destructeur de la méthode présentée *supra*, basée sur un prélèvement récurrent de substrats naturels, est à prendre en considération. Des méthodes alternatives non destructrices des macrophytes, telles que le BEDI (Benthic Dinoflagellate Integrator) ou les substrats artificiels, existent.

La méthode dite du BEDI, décrite par Mangialajo *et al.* (2017), consiste à placer verticalement un cylindre sur le substrat que l'on veut échantillonner, puis à remettre en suspension à l'intérieur de celui-ci les microalgues benthiques présentes sur ce substrat *via* une agitation vigoureuse de l'eau à l'intérieur du cylindre (Figure 35). Par la suite, une partie de l'eau contenue dans ce cylindre est prélevée (250 mL) puis fixée avec du lugol acide (1 à 2% vol/vol) . Les mesures d'abondance d'*Ostreopsis* sont ensuite exprimées, après comptage, en nombre de cellules par surface au sol échantillonnée par le BEDI (cellules.cm⁻²). Il s'agit alors d'un mélange d'*Ostreopsis* du compartiment benthique qui étaient fixées sur le substrat et d'*Ostreopsis* présentes dans l'eau prélevée avec le cylindre.

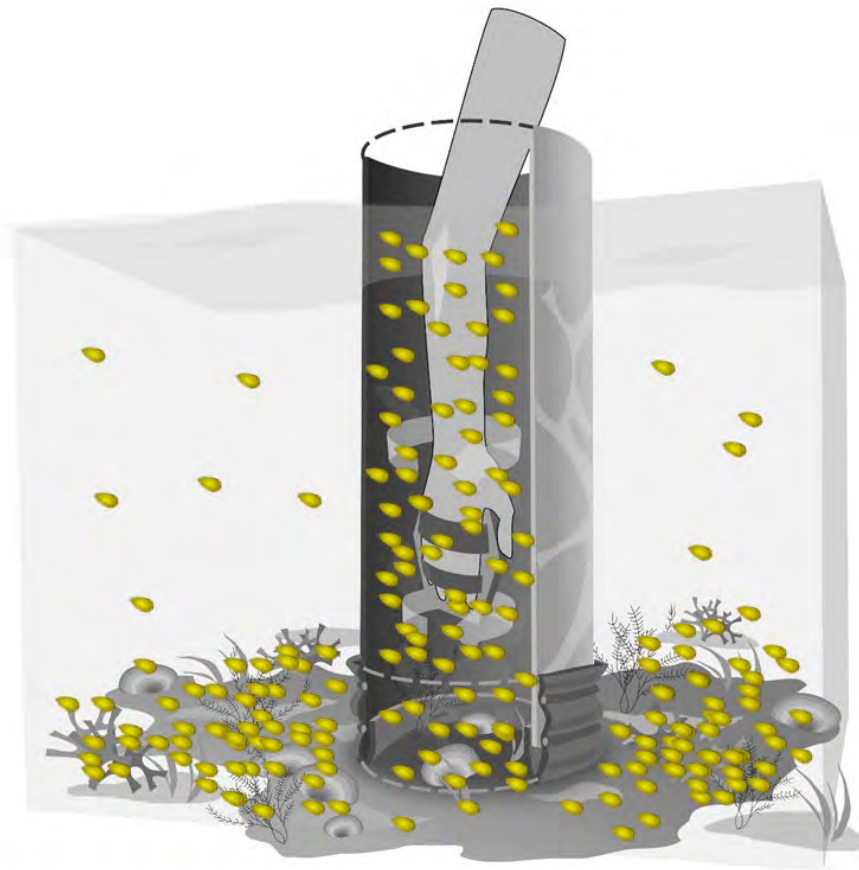


Figure 35 : représentation schématique de l'utilisation du BEDI sans port d'équipement de protection individuel (EPI)

Echantillonnage des cellules sur substrats artificiels

Il est possible aussi d'utiliser des substrats artificiels lestés et équipés de flotteurs pour collecter les cellules d'*Ostreopsis* sur une surface standardisée (Figure 36 et Figure 37). L'utilisation de substrats artificiels repose sur l'immersion dans la colonne d'eau de morceaux de toile en fibre de verre ou en nylon (type moustiquaire), de porosité optimale de 1-3 mm pour collecter un maximum de cellules, placés à proximité des zones potentielles de développement d'*Ostreopsis*, (Tester *et al.*, 2014, 2022 ; Jauzein *et al.*, 2016). L'immersion est généralement de 24 heures. Le substrat artificiel est récupéré en l'introduisant délicatement avec son eau environnante dans un flacon ou un sac en plastique. Les mesures d'abondance d'*Ostreopsis* sont ensuite exprimées après comptage, en nombre de cellules par surface de fibre de moustiquaire échantillonnée (cells. cm⁻²). Les cellules d'*Ostreopsis* collectées *via* cette technique sont des cellules qui s'accrochent au substrat artificiel. Il s'agit par conséquent d'une méthode qui intègre sur 24h la colonisation d'un substrat par les cellules d'*Ostreopsis* présentes dans le compartiment planctonique.

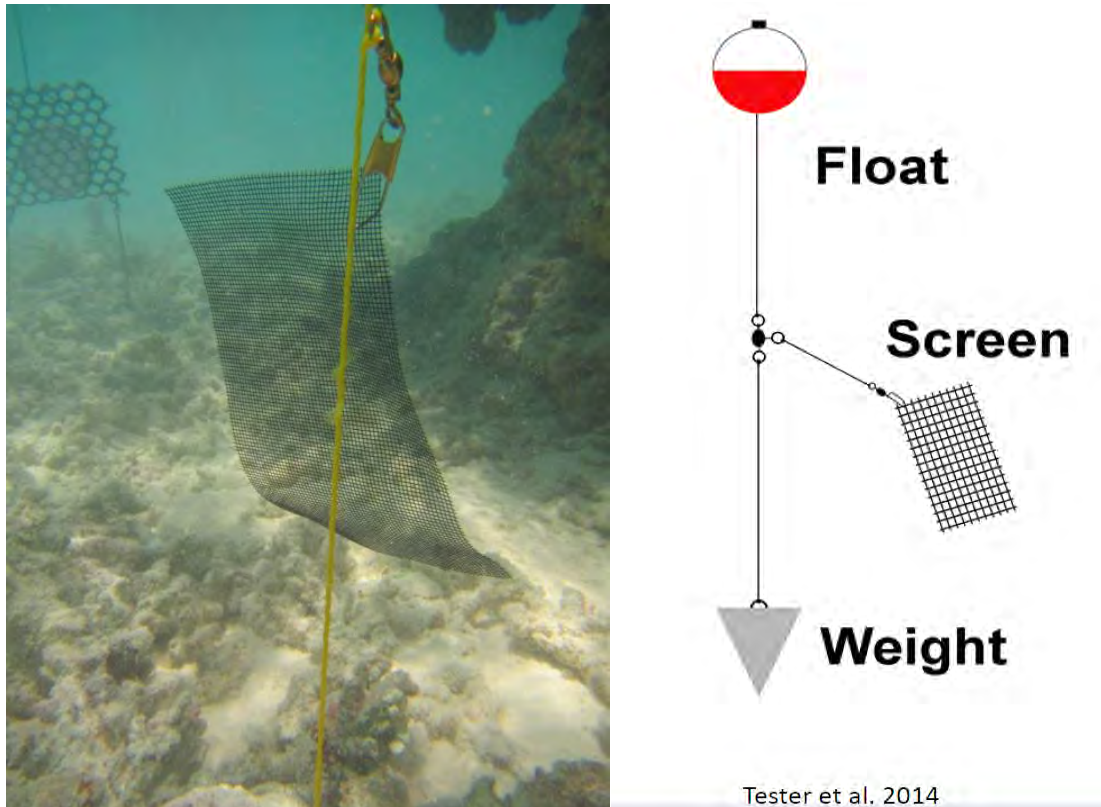


Figure 36 : Mise en place de substrats artificiels.

Il s'agit ici de la méthode développée par Tester *et al.*, 2014, principalement pour les espèces du genre *Gambierdiscus*, dans les régions tropicales

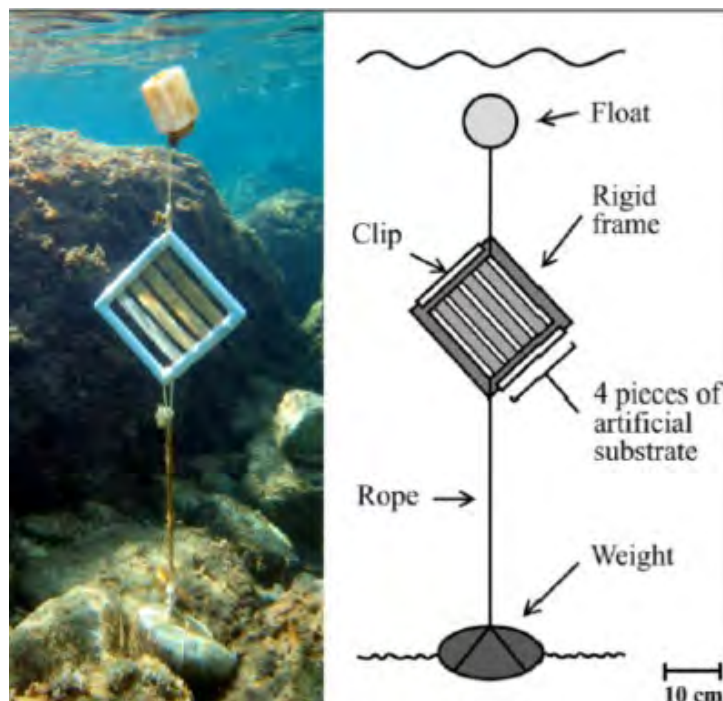


Figure 37 : Méthode des substrats artificiels pour le prélèvement spécifique d'*Ostreopsis*, en zones tempérées, développé par Jauzein *et al.* (2016),

Autres substrats (roches avec macroalgues gazonnantes, roche sans macroalgue, galets, sable, vase, etc.)

Plusieurs études ont décrit la présence d'*Ostreopsis* dans des échantillons de sédiments (Faust, 1999 ; Mohammad-Noor *et al.*, 2004 ; Ten-Hage *et al.*, 2000 ; Vila, Garces, Maso, 2001). Ces échantillons peuvent être prélevés à la cuillère ou au carottier. Pour les prélèvements sur les autres substrats (macroalgues gazonnantes, roche, galet, vase), les techniques de prélèvement sont rarement détaillées dans les publications.

Il est important de préciser qu'à ce jour, il n'y a pas de stratégies d'échantillonnage ou de méthode de prélèvement d'*Ostreopsis* harmonisé, et que chaque méthode a ses spécificités, ce qui rend très difficile la comparaison des abondances entre zones si les techniques d'échantillonnage sont différentes.

9.2.3 Prélèvements des aérosols

Il n'existe pas de **méthode normalisée** de collecte d'aérosols marins côtiers quelle que soit la substance chimique ou l'agent pathogène recherché. Les méthodes de prélèvement sont définies selon l'objectif de l'étude menée et la nature du terrain. Les prélèvements sont réalisés généralement dans les milieux définis « à risque », en lien avec le nombre d'intoxications déclarées.

Prélèvements en milieu naturel :**– *Ostreopsis***

À ce jour, il n'existe que deux études portant sur la recherche de débris cellulaires et de toxines d'*Ostreopsis* dans les aérosols naturels (Casabianca *et al.*, 2013 ; Ciminiello *et al.*, 2014). Dans le cadre de ces études, les collectes d'aérosols ont été réalisées grâce à des échantillonneurs fixes placés sur la plage, à proximité de la zone de surf (brisure des vagues), à une distance de la mer comprise entre 50 cm (Casabianca *et al.*, 2013) et 10 m (Ciminiello *et al.*, 2014). Dans l'étude de Casabianca, des prélèvements sur filtres à l'aide d'un échantillonneur à grand volume ($30 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$) ont été réalisés en continu pendant trois jours, avec un changement de filtres toutes les six ou sept heures. Dans la seconde étude, deux échantillonneurs d'air différents ont été utilisés (un avec système de filtration de l'air et un avec un système de barbotage³⁹), avec des durées de prélèvements variant entre une heure et demie et six heures, et des débits d'air compris entre 0,6 et $1,8 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$. Le succès de ces deux approches pour détecter soit des débris de cellules d'*Ostreopsis* (Casabianca *et al.*, 2013) soit l'OVTX-a (Ciminiello *et al.*, 2014) suggère que diverses techniques de collecte d'aérosols sont capables de détecter les toxines dans l'atmosphère côtière.

– Brevétoxines et yessotoxine

Si la littérature disponible sur la dispersion des toxines et débris cellulaires d'*Ostreopsis* dans les aérosols est très limitée, elle est plus fournie pour le dinoflagellé *Karenia brevis*, producteur de brevétoxines, dont les proliférations massives en Floride conduisent à des symptômes

³⁹ Cette technique de barbotage consiste à faire circuler l'air dans un fluide, ce qui permet le transfert des particules et molécules de l'air vers le fluide (SAS PCR, WR International PBI, Italy ; Ciminiello *et al.*, 2014).

cliniques similaires à ceux d'*Ostreopsis* (Fleming *et al.*, 2009, Anses, 2021). Une transposition des stratégies d'échantillonnage développées pour le suivi des brevétotoxines dans les aérosols pourrait être envisagée dans le cadre des proliférations d'*Ostreopsis*. Ainsi, l'échantillonnage des brevétotoxines dans les aérosols se fait lorsque le vent vient du large vers la côte, ce qui a pour effet de transporter les toxines vers la côte (Pierce *et al.*, 2005 ; Kirkpatrick *et al.*, 2010). L'échantillonnage des brevétotoxines est réalisé sur des périodes variant de 1 à 15 heures selon les études (Cheng *et al.*, 2005 ; Pierce *et al.*, 2005 ; Kirkpatrick *et al.*, 2010 ; Fleming *et al.*, 2019) et il est effectué à l'aide de filtres en fibre de verre (Pierce *et al.*, 2005 ; Cheng *et al.*, 2005) ou en cellulose (Cheng *et al.*, 2005) placés dans des collecteurs d'air à grand volume (filtration d'air). Les auteurs de ces travaux (qui appartiennent tous au même groupe de recherche) s'accordent sur la nécessité d'échantillonner en journée, pendant une durée inférieure à 12h afin d'éviter la dégradation des toxines piégées sur les filtres dans les collecteurs. Le volume d'air collecté pendant cette durée d'échantillonnage est variable ; il dépend de l'instrument utilisé et n'est pas toujours renseigné (Backer *et al.*, 2005 ; Cheng *et al.*, 2005 ; Kirkpatrick *et al.*, 2010).

Une récente étude rapporte la présence de yessotoxine dans les aérosols associés à une prolifération massive du dinoflagellé *Lingulodinium polyedra* en Californie en 2020 (Ternon *et al.*, 2023). Les auteurs ont utilisé une pompe à vide connectée à un filtre en quartz (Van Acker *et al.*, 2020) installé dans un porte-filtre, qui a été placé pour des facilités d'échantillonnage, à 50 m au-dessus de la zone de surf (sur un ponton) sur des périodes de 24h et avec un débit d'air égal à $3 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$, correspondant à un volume d'air total échantillonné de 72 m^3 .

Les pratiques de collecte de toxines de micro-algues dans les aérosols naturels (air ambiant⁴⁰) sont résumées dans les Tableau XXI et Tableau XXII de l'annexe 4 qui met en lumière l'hétérogénéité de ces pratiques. Des expérimentations en milieu contrôlé pourraient aider à établir un protocole standardisé.

Prélèvements en milieu contrôlé: Des études expérimentales, réalisées à l'aide d'un générateur artificiel d'aérosols marins en milieu clos, révèlent qu'une simple pompe à vide connectée à un porte-filtre collecte efficacement les toxines d'*Ostreopsis* dans les aérosols (Ternon *et al.*, in prep. ; Médina-Pérez *et al.*, 2021). Les débits ($0,0096$ et $2,29 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$) et durées de collecte (1 à 20 heures) utilisés dans ces deux études ont permis d'échantillonner $0,94$ et $2,29 \text{ m}^3$ d'air, respectivement. Dans ces deux études, des filtres en quartz ont été utilisés en accord avec d'autres travaux réalisés dans des conditions similaires mais portant sur d'autres toxines de microalgues (Van Acker *et al.*, 2021). Ainsi, ces expériences de laboratoire suggèrent que l'utilisation d'une pompe de prélèvement d'air sur filtres en quartz permet de collecter des OVTX en milieu naturel. L'une des études suggère une plus grande concentration d'OVTX dans les aérosols en fin de phase exponentielle de croissance des cellules (division cellulaire maximale) d'*O. cf. ovata* (Médina-Pérez *et al.*, 2021). Si ces expérimentations en milieu contrôlé ont bien permis de confirmer le processus d'aérosolisation des OVTX, elles ne prennent pas en compte la dispersion des aérosols dans l'atmosphère, ce qui les rend peu représentatives de la réalité du terrain (voir chapitre contamination, partie Aérosols). Elles sont néanmoins indispensables pour une meilleure compréhension des facteurs biotiques et abiotiques qui influencent les mécanismes d'aérosolisation des OVTX.

⁴⁰ Air ambiant= air extérieur

9.2.4 Prélèvements des organismes marins

Dans le cadre de projets de recherche (Accoroni *et al.*, 2022, Aligizaki *et al.*, 2008 ; Amzil *et al.*, 2012 ; Biré *et al.*, 2013 et 2015 ; Brissard *et al.*, 2014), la collecte d'organismes sédentaires (mollusques bivalves et gastéropodes, échinodermes) se fait directement en plongée alors que les poissons ou les céphalopodes sont le plus souvent prélevés à l'aide d'un fusil de chasse sous-marine. Certains poissons sont prélevés directement avec une canne à pêche (petites saupes, murènes).

Dans le cadre d'EMERGTOX, les prélèvements sont réalisés selon le cahier de prescription de REPHYTOX (REPHY, 2023).

9.3 Méthodes pour l'identification et le dénombrement des *Ostreopsis*

Ce paragraphe décrit les méthodes actuellement utilisées pour dénombrer les cellules d'*Ostreopsis* dans les différents compartiments.

9.3.1 Préparation des échantillons avant comptage et observation

9.3.1.1 Fleurs d'eau

Les échantillons de fleurs d'eau ayant été prélevés dans un flacon font l'objet d'un prélèvement des fragments de fleurs d'eau à l'aide d'une pince brucelle en vue d'une analyse qualitative (reconnaissance du genre *Ostreopsis*). Ces fragments sont disposés entre une lame et une lamelle de verre adaptées à la microscopie. Quelques gouttes d'eau de mer filtrée sur 0,2 µm sont ajoutées aux fleurs d'eau sur la lame pour qu'elles puissent être observées à l'aide d'un microscope droit. Seule une identification au niveau du genre *Ostreopsis* est possible en microscopie optique.

9.3.1.2 Echantillons d'eau

Les échantillons d'eau prélevés dans le compartiment planctonique et fixés au lugol acide, permettent de faire des analyses qualitatives (reconnaissance du genre) et quantitatives (dénombrement des cellules) des cellules planctoniques d'*Ostreopsis*.

Ces échantillons prélevés selon les préconisations décrites au paragraphe 9.2.1) sont homogénéisés (via une légère agitation) puis un volume déterminé est versé dans la colonne d'une chambre d'observation (ex : Hydrobios®) pour sédimentation, dans un volume d'eau qui varie entre 10 et 100 mL selon la méthode d'Utermöhl (1931).

Dans le cadre du REPHY (Neaud-Masson, 2020, le protocole « Observation et dénombrement du phytoplancton marin par microscopie optique. Spécifications techniques et méthodologiques appliquées au REPHY. Version 2 – février 2020. ODE/VIGIES/20/03) est suivi et 10 mL des échantillons d'eau sont mis à sédimenter. L'ajout du lugol se fait sur le terrain ou directement dans la colonne à sédimenter au laboratoire.

En fonction du volume utilisé (10 à 100 mL), il faut attendre entre 8h et 24h, à l'abri de la lumière et à température ambiante (entre 19 et 25 °C) afin que l'ensemble des cellules de microalgues sédimentent sur la lamelle de la chambre d'observation (ex : Hydrobios ®) (Utermöhl, 1931). Le comptage est ensuite réalisé à l'aide d'un microscope inversé. La lecture doit être réalisée dans les 24h.

L'unité d'abondance utilisée est le nombre de cellules d'*Ostreopsis* par litre (cell.L⁻¹).

9.3.1.3 Echantillon prélevé sur macrophytes ou substrat artificiel

Les échantillons de macrophytes fixés au lugol (cf. optimisation du protocole par Jauzein *et al.*, 2018), dans leur flacon plastique, sont fortement agités pendant 10 secondes, afin de décrocher les microalgues adhérentes/attachées aux macrophytes. L'eau est récupérée au travers d'un tamis de 500 µm. Le macrophyte resté sur le tamis est rincé deux fois avec, à chaque fois, après resuspension dans 100 ml d'eau de mer filtrée sur 0,2 µm suivie d'une agitation pendant 10 sec (cf. Jauzein *et al.*, 2018). Les eaux des deux rinçages sont combinées avec l'eau issue de la première agitation et le volume total est consigné. C'est dans cette eau que se fera le comptage des cellules d'*Ostreopsis*, en utilisant une lame calibrée de 1 mL (type Sedgewick Rafter) avec un microscope droit. Le macrophyte est séché rapidement avec du papier absorbant puis pesé. La masse fraîche de macrophyte est consignée.

L'unité d'abondance est le nombre de cellules d'*Ostreopsis* par gramme de poids frais.

La méthode appliquée pour les substrats artificiels est décrite par Tester *et al.* (2014) et a été optimisée pour *Ostreopsis* en Méditerranée par Jauzein *et al.* (2016). La séparation des microalgues du substrat ainsi que le comptage des cellules se font en suivant les méthodes décrites au-dessus pour les macrophytes. L'unité d'abondance utilisée est le nombre de cellules d'*Ostreopsis* par cm².

9.3.2 Comptages cellulaires

9.3.2.1 Par microscopie optique inversée après sédimentation (Utermöhl) ou avec un microscope droit sur des lames calibrées de 1 mL

Les comptages cellulaires sont effectués à l'aide d'un microscope inversé pour la méthode Utermöhl ou d'un microscope droit si des lames calibrées de 1 mL (ex : Sedgewick Rafter) sont utilisées.

Les bonnes pratiques liées à la méthode Utermöhl sont présentées dans la norme « EN 15204 Water quality – Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy (Utermöhl technique) ».

La chambre de comptage (ex : Hydrobios) est placée sur la platine d'un microscope optique inversé. La totalité de la cuve est comptée. Cependant, en cas de trop fortes abondances cellulaires, les cellules d'*Ostreopsis* se recouvrent et le comptage devient difficile. Il faut alors diluer l'échantillon (1/5 ou 1/10) avec de l'eau de mer filtrée sur 0,2 µm et refaire une sédimentation et un comptage.

Pour les lames calibrées de 1 mL, type Sedgwick Rafter, la totalité de la lame est comptée. En cas de très forte abondance, soit l'échantillon est dilué, soit seule une partie de la lame fait l'objet d'un comptage (les lames Sedgwick Rafter sont gravées (lignes et colonnes) permettant de compter 1/40 ou 1/100 de l'échantillon).

Dans les deux cas (méthode Utermöhl ou lame calibrée de 1 mL), un minimum de 200 à 400 cellules d'*Ostreopsis* est compté, pour avoir un intervalle de confiance sur les comptages entre 14% et 10%, respectivement⁴¹. Cela n'est pas toujours possible (en particulier avant et après les périodes de proliférations d'*Ostreopsis*, lorsque le nombre de cellules dans 1 mL est trop faible) ; dans ce cas toutes les cellules présentes sur la lame sont comptées.

La reconnaissance du genre *Ostreopsis* est facile en microscopie optique, grâce à la forme en goutte d'eau des cellules. En revanche, il est très complexe et souvent impossible de différencier les espèces : c'est notamment le cas entre *O. cf. ovata* et *O. cf. siamensis* qui ne peuvent être distinguées en microscope optique classique (Chomérat *et al.*, 2022). Seules les méthodes moléculaires permettent de les distinguer.

9.3.2.2 Autres techniques de comptage

La méthode opto-électronique en 3D développée par Sbrana *et al.* (2017) a été testée de manière satisfaisante en combinaison avec la détermination des concentrations cellulaires par microscopie optique et biologie moléculaire (Vassalli *et al.*, 2018). Cette méthode permet la reconnaissance automatique, puis le comptage, des cellules d'*Ostreopsis*. Elle est néanmoins assez longue à mettre en œuvre et nécessite la prise et l'analyse d'images par un ordinateur. Une trop forte concentration de cellules, avec des chevauchements de cellules d'*Ostreopsis*, perturbe la reconnaissance et le comptage. Il n'est pas possible de discriminer *O. cf. ovata* de *O. cf. siamensis* avec cette méthode.

9.4 Approches de biologie moléculaire

9.4.1 PCR- quantitative

La PCR (polymerase chain reaction) peut être utilisée pour identifier et potentiellement quantifier les espèces du genre *Ostreopsis* dans des échantillons prélevés dans les compartiments planctonique ou benthique. Des sondes spécifiques existent pour quantifier par PRC quantitative (qPCR), les abondances en *Ostreopsis* et différencier *O. cf. ovata* et *O. cf. siamensis* à partir de leur ADN ribosomal (ADNr 8S). La qPCR permet de détecter rapidement les cellules d'*Ostreopsis*, même à des abondances inférieures à la limite de résolution en microscopie. C'est une technique souvent utilisée en complément de la microscopie (Casabianca *et al.*, 2014 ; Hariganeya *et al.*, 2013 ; Park *et al.*, 2020 ; Toldrà *et al.*, 2019 ; Vassalli *et al.*, 2018, Drouet, 2021, Penna *et al.*, 2007) (Tableau XIV).

41

https://repository.oceanbestpractices.org/bitstream/handle/11329/303/WKNCT_Handbook_ver5May2010_2.pdf?sequence=1&isAllowed=y (consulté le 26 janvier 2023)

La principale limite de cette technique est la difficulté d'avoir une relation directe entre la quantification de l'ADN spécifique d'une espèce et l'abondance de cette espèce. En effet, le nombre de copies des gènes ciblés est très variable en fonction des espèces et des conditions environnementales. Cette technique n'est donc pas encore utilisable, pour des suivis réguliers d'*Ostreopsis* (Rafaelle Siano, Ifremer, comm. pers.).

Tableau XIV : Couples d'amorces créées par Penna *et al.* (2007) pour la détecter d'*Ostreopsis* spp., d'*O. cf. siamensis* et d'*O. cf. ovata*.

| Cible | Amorces | Séquence (5'→3') | %GC | Amplicon (bp) | Référence |
|--|--------------|------------------------|-------|---------------|-------------------------------|
| 5.8S <i>Ostreopsis</i> spp. | Ostreopsis F | AAAACGATATGAAGAGTGACGC | 40,9 | 92 | Penna <i>et al.</i> (2007) |
| | Ostreopsis R | CCAGGAGTATGCCTACATTCAA | 45,5 | | |
| ITS1-5.8S <i>Ostreopsis cf. siamensis</i> | Siamensis F | TGTTACCATTGCTGAGTTTG | 40,0 | 223 | |
| | Ostreopsis R | CCAGGAGTATGCCTACATTCAA | 45,5 | | |
| ITS1-5.8S <i>Ostreopsis cf. ovata</i> | Ovata F | CAATGCTCATGTCAATGATG | 40,00 | 210 | |
| | Ostreopsis R | CCAGGAGTATGCCTACATTCAA | 45,5 | | |

L'analyse de l'ADN environnemental (eDNA) a déjà été utilisée pour démontrer la présence d'ADN d'*Ostreopsis* en Atlantique (Drouet *et al.*, 2022). Néanmoins, cette technique n'est pas quantitative et ne permet pas de déterminer si des cellules vivantes de microalgues sont présentes dans les matrices échantillonnées (il peut s'agir simplement de la présence de fragments d'ADN issus de cellules mortes). Cette technique ne peut donc pas être utilisée pour réaliser des suivis réguliers de la qualité des eaux de baignade.

9.5 Analyse des toxines

9.5.1 Traitement des échantillons

9.5.1.1 Extraction des toxines intracellulaires

L'extraction des toxines peut être réalisée à partir de cellules fraîches issues de prélèvements réalisés dans les compartiments planctonique et benthique.

Les cellules collectées sont concentrées par centrifugation (Ternon *et al.*, 2022a) ou sur un filtre en fibre de verre (GF/F d'une porosité moyenne de 0,7 µm). Le culot cellulaire ou le filtre peuvent être stockés à -20 ou -80°C en attente d'analyse. Les vitesses et temps de centrifugation, ou le vide nécessaire à la filtration sur GF/F ne sont pas identiques dans les différentes publications décrivant cette phase. Il est important d'optimiser ces paramètres afin de ne pas altérer l'intégrité des cellules d'*Ostreopsis*. Une pression de filtration de 5 mmHg et une vitesse de centrifugation de 800 g sont généralement utilisés (Ternon *et al.*, 2018 ; Ternon *et al.*, 2022a). Les toxines contenues dans la pelote de cellules après centrifugation ou sur le filtre sont extraites avec un mélange de méthanol (MeOH): H₂O (1 :1, v/v ; Ciminiello *et al.*, 2006 ; Gémin *et al.*, 2020) ou MeOH 100% (Ternon *et al.*, 2018 ; Berdalet, comm. pers.). L'extrait obtenu est souvent filtré à travers des filtres de nylon, éventuellement concentré sous flux d'azote, puis stocké à -20°C avant l'analyse des toxines (Berdalet, comm. pers.).

9.5.1.2 Extraction des toxines extracellulaires

Pour pouvoir collecter et analyser les toxines extracellulaires, il faut dans un premier temps séparer les cellules de l'eau (cf. techniques décrites en 9.5.1.1). Les toxines extracellulaires (dissoutes) contenues dans les échantillons d'eau collectés dans le compartiment planctonique peuvent ensuite être extraites de deux manières différentes : i) par extraction liquide-liquide avec un volume identique de butanol (Ciminiello *et al.*, 2008 ; Pezzolezzi *et al.*, 2012), ii) par extraction sur phase solide avec des résines polymériques comme les HLB (Uchida *et al.*, 2013 ; Zendong *et al.*, 2014), les StrataX (Phenomenex, Selwood *et al.*, 2012 ; Zendong *et al.*, 2014), les SDBL (Phenomenex^(ND)) (Ternon *et al.*, 2022c) ou des résines de silice greffées type C₁₈ (Zendong *et al.*, 2014 ; Ternon *et al.*, 2018). Les résines SDBL sont les plus efficaces pour l'extraction des OVTX dissoutes (Ternon *et al.*, 2022 c). Les solvants d'élution généralement utilisés pour désorber les toxines des résines sont le méthanol (Zendong *et al.*, 2014 ; Ternon *et al.*, 2018), un mélange MeOH : H₂O (1 :1, v/v ; Zendong *et al.*, 2014, ou 9 :1, v/v ; Ternon *et al.*, 2022c) ou un mélange de propanol/eau/acide acétique (40/59/1, v/v ; Uchida *et al.*, 2013). Les extraits organiques obtenus à la suite des extractions liquide-liquide ou sur phase solide sont concentrés sous flux d'azote ou par évaporation rotative puis stockés à -20°C jusqu'à analyse des toxines.

9.5.1.3 Extraction des toxines dans les aérosols (naturels, expérimentaux)

Une fois l'échantillonnage terminé, les collecteurs d'aérosols sont stoppés, les filtres de quartz récupérés avec des pinces métalliques et pliés en deux puis placés dans un cryotube⁴² (ou une petite enveloppe en papier aluminium) à -20°C avant extraction des toxines. Les toxines d'*O. cf. ovata* sont immédiatement extraites avec de l'éthanol (Ciminiello *et al.*, 2014) ou un mélange MeOH : H₂O (1:1, v/v) (Médina-Pérez *et al.*, 2021) ou du MeOH 100% (Berdalet, pers. data). Selon les pratiques actuelles de stockage, les extraits sont stockés à +4°C (Ciminiello *et al.*, 2014), si leur analyse est effectuée rapidement (< 1 semaine), à -20°C pour un stockage jusqu'à 6 mois ou à -80°C pour un stockage sur le plus long terme (> 6 mois) (Berdalet, communication personnelle).

9.5.1.4 Produits de la mer

Les toxines du groupe de la PLTX ont été analysées dans différentes matrices d'organismes marins (tout ou parties de mollusques, échinodermes, crustacés, poissons, éponges).

Il existe dans la littérature un très grand nombre de méthodes d'extraction qui diffèrent de par la nature, la combinaison et les proportions des solvants utilisés. De même, les organismes marins étant des matrices biologiques complexes, certaines méthodes d'extraction incorporent des étapes de purification/concentration de type extraction liquide-liquide (LLE) ou l'extraction en phase solide (SPE).

Le choix du (des) solvant(s) d'extraction est primordial car il va conditionner l'efficacité de la procédure d'extraction à l'égard des matrices biologiques complexes des produits de la mer ainsi que la méthode d'analyse appliquée sur l'extrait obtenu afin de réduire l'effet matrice ». Ainsi, dans le cadre de tests immunologiques, le solvant utilisé pour extraire les toxines du groupe de la PLTX de différentes matrices telles que des tissus de mérrou, palourdes, moules, huîtres, coques et coquilles Saint-Jacques est le méthanol aqueux (50 à 80% MeOH) (Amzil

⁴² tube résistant à la cryogénéation par azote liquide (-196°C) et la congélation à -80°C

et al., 2012 ; Boscolo *et al.*, 2013 ; Pelin *et al.*, 2016 ; Cavion *et al.*, 2022 ; Yakes *et al.*, 2011), alors que dans le cas de *Palythoa tuberculosa*, l'éthanol aqueux (70% EtOH) est utilisé à la place du méthanol (Bignami *et al.*, 1992).

Pour les tests hémolytiques, l'EtOH aqueux (70%) a été utilisé sur des échantillons de moules et de praires (Aligizaki *et al.*, 2008 ; Espina *et al.*, 2009), avec par la suite des étapes de purification LLE utilisant de l'éther diéthylique (DEE) pour l'élimination des lipides, ainsi que du n-butanol (BuOH). Volpe *et al.* (2014) ont utilisé 90% de MeOH aqueux pour l'extraction de PLTX dans des moules *Mytilus galloprovincialis*, avec ensuite une étape de SPE sur cartouche Oasis HLB (60 mg, 3 mL).

En ce qui concerne les tests de cytotoxicité sur lignées cellulaires, les toxines du groupe de la PLTX sont extraites des moules avec des proportions en MeOH aqueux comprises entre 50 et 100% (Espina *et al.*, 2009 ; Ledreux *et al.*, 2009 ; Pelin *et al.*, 2016). Bellocci *et al.* (2008) utilisent successivement de l'EtOH et du MeOH pour les moules, avec ensuite une partition DCM/MeOH pour finalement resuspendre l'extrait sec dans un mélange EtOH/diméthylsulfoxyde (DMSO). Pour les oursins, *Paracentrotus lividus*, ces mêmes auteurs utilisent 50% de MeOH acidifié.

Pour le bioessai sur souris (BES), le protocole décrit par Yasumoto *et al.* (1978) pour l'extraction de l'acide okadaïque dans des coquillages et utilisant de l'acétone a été repris pour l'extraction de la PLTX à partir de moules et de praires (Aligizaki *et al.*, 2008 ; Espina *et al.*, 2009). Aligizaki *et al.* (2008) ont également utilisé de l'EtOH aqueux (70%) avec par la suite des étapes de purification LLE utilisant du DEE pour l'élimination des lipides, et du BuOH.

Dans le cadre de l'analyse par LC-MS/MS, différents solvants d'extraction ont été testés sur des homogénats de glandes digestives de moules dopées avec de la PLTX : EtOH, MeOH/eau (50/50) avec 0,2 % d'acide acétique, éthanol/eau (80/20), méthanol 100% et mélange méthanol/eau (80/20 et 90/10) (Amzil *et al.*, 2012). Les rendements d'extraction obtenus montrent que le mélange MeOH/eau (90/10) est le solvant le plus efficace puisqu'il permet d'extraire 95% de la PLTX. L'application de ce solvant d'extraction (méthanol 90%) sur différentes matrices de mollusques dopées avec la PLTX permet des taux de récupération variant de 75% à 115% en fonction du type de matrice (Amzil *et al.*, 2012). Ces résultats corroborent en général ceux obtenus par Ciminiello *et al.* (2011), en termes d'efficacité du solvant et de rendements d'extraction. Le dopage de trois matrices avec de la PLTX (moules, oursins, anchois) suivi de l'extraction par quatre solvants différents (MeOH/H₂O 1:1, MeOH/H₂O 8:2, MeCN (acétonitrile)/H₂O 8:2 et MeOH 100%) a montré l'efficacité du MeOH 80% puisque le rendement d'extraction de la PLTX était de 92%, 89% et 56% pour les moules, les oursins et les anchois respectivement.

9.5.2 Méthodes d'analyse des toxines

9.5.2.1 Méthodes physico-chimiques

Les méthodes d'analyse physico-chimiques permettent l'identification et la quantification des toxines de microalgues dans un échantillon donné. Ce sont principalement des méthodes utilisant la chromatographie liquide (LC) couplée à différents types de détecteurs comme la détection par ultraviolet (UV), par fluorescence (FLD) ou par spectrométrie de masse (SM). À l'heure actuelle, hormis la PLTX, le manque d'outils de contrôle qualité notamment de matériaux de référence de toxines d'*Ostreopsis* (étalon de toxine de haute pureté (certifié),

matrice biologique contenant une teneur en toxine certifiée) ne permet pas de développer et d'harmoniser des procédures validées pour la quantification des toxines d'*Ostreopsis* dans les différentes matrices.

Analyse en LC-UV

La détection des toxines du groupe de la PLTX par spectrométrie UV est possible grâce à la présence de deux groupements chromophores dans les molécules cibles (Moore et Scheuer, 1971). Elle peut être utilisée en association avec l'électrophorèse capillaire (CE) (Mereish et al., 1991) et la chromatographie liquide (LC) (Mereish et al., 1991). Les maximums d'absorption en UV de la PLTX, déterminés à l'aide d'un détecteur à barrettes diode (DAD), correspondent aux longueurs d'ondes suivantes : $\lambda = 233$ nm (coefficient d'absorption molaire $\epsilon = 47\,000$) et $\lambda = 263$ nm ($\epsilon = 28\,000$) (Hirata et al., 1979). Le rapport des absorbances UV entre 233 nm et 263 nm est de 1,71 (Moore et Scheuer, 1971). Le spectre UV est caractéristique des toxines du groupe de la PLTX ce qui permet de les rechercher dans les échantillons des matrices traitées. Ce spectre UV est différent de celui des mascalénotoxines (McTX-A et McTX-B) (Lenoir et al., 2004 ; 2006). La méthode LC/UV a été utilisée pour la détermination des toxines du groupe de la PLTX dans des extraits de cellules d'*Ostreopsis* cf. *ovata* et *O. cf. siamensis*, isolées du Brésil et de la Méditerranée occidentale, en combinant plusieurs colonnes chromatographiques et phases mobiles (Yasumoto et al., 1986 ; Oku et al., 2004 ; Penna et al., 2005 ; Riobó et al., 2006). En dehors des analyses de microalgues, cette méthode ne peut être utilisée pour la quantification de la PLTX et analogues dans d'autres matrices biologiques marines complexes (ex coquillages) en raison du manque de spécificité de la détection UV puisque d'autres substances présentes naturellement dans la matrice peuvent absorber aux mêmes longueurs d'ondes UV que les toxines d'intérêt (Noguchi et al., 1988 ; Riobó et al., 2006). De plus, d'après Riobó et al. (2006), cette méthode n'est pas très sensible puisque la limite de détection des toxines du groupe de la PLTX dans les différentes souches d'*Ostreopsis* étudiées était de l'ordre de 1 à 2 μg d'étalon de PLTX injecté dans la colonne du système analytique LC/UV. Il n'était pas toujours possible de détecter un pic et d'obtenir un spectre UV pour confirmation de la présence de ces toxines dans les extraits d'*Ostreopsis*. Compte tenu du seuil sanitaire de 30 μg (PLTX + OST-D). kg^{-1} de chair, proposé par l'EFSA (EFSA, 2009), il est très peu probable que cette méthode puisse être utilisée pour la surveillance réglementaire de la PLTX et de ses analogues dans la chair des coquillages.

Analyse en LC-FLD

Il est communément admis que la détection par fluorescence (FLD) est plus sensible que la détection par UV. À défaut d'une fluorescence naturelle de la PLTX (Lau et al., 1995), cette dernière peut faire l'objet d'une dérivation avant séparation chromatographique en utilisant le réactif de dérivation « 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate » (AccQ-Fluor) qui réagit avec le groupement amine terminal de la PLTX (Riobó et al., 2006). La PLTX dérivée montre une forte fluorescence à 395 nm lorsqu'elle est excitée à 250 nm. La limite de détection (LD) pour la PLTX dérivée est alors de 0,75 ng d'étalon injecté dans la colonne, et sa limite de quantification de 2 ng ce qui rend cette méthode beaucoup plus sensible que la LC/UV. La LC-FLD a été appliquée avec succès pour la détermination et la quantification de la PLTX chez *P. tuberculosa*, ainsi que des toxines du groupe de la PLTX (OST-D suspectée, d'après la masse des ions fragments proche de ceux de l'OST-D) dans des extraits méthanoliques purifiés de

plusieurs souches d'*Ostreopsis* en culture. Les critères de performance de la méthode et l'absence d'interférences avec des effets possibles sur la quantification, indiquent une robustesse suffisante de la méthode pour une application potentielle en routine, après optimisation sur des extraits de mollusques, crustacés, poissons (Riobó *et al.*, 2006).

Analyse LC-MS(/MS)

Pour la détection de quantités inférieures à 0,75 ng, la séparation chromatographique doit être couplée à un détecteur de spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) ou haute résolution (LC/HRMS), ce qui est réalisé dans la plupart des études mesurant les concentrations en toxines dans différentes matrices environnementales (air, eau, microalgues, invertébrés) (Ciminiello *et al.*, 2006 ; Ciminiello *et al.*, 2008 ; Pezzolezzi *et al.*, 2012 ; Ciminiello *et al.*, 2014 ; Brissard *et al.*, 2014 ; Ternon *et al.*, 2018 ; Médina-Pérez *et al.*, 2021, Ternon *et al.*, 2022a). La limite de détection de ce type d'analyse dépend de l'instrument et des conditions d'analyse. Certaines études fournissent des limites de détection exprimées en concentration détectable par l'appareil, et non pas en quantité de toxines par masse d'échantillon. À titre d'exemple, les concentrations minimales en toxines suivantes ont pu être quantifiées dans les cellules (2,3 - 40 fg. cell⁻¹ ; Chomérat *et al.*, 2022 ; Accoroni *et al.*, 2017), le compartiment extracellulaire (3,15 - 11 µg.L⁻¹ ; Ternon *et al.*, 2022a ; Pezzolesi *et al.*, 2012) et les aérosols (2,4 - 3 pg.L⁻¹ air ; Ciminiello *et al.*, 2014 ; Médina-Pérez *et al.*, 2021). En laboratoire des concentrations maximales en toxines de 234 pg.L⁻¹ d'air ont été mesurées (Medina-Perez, 2023). Seules les études portant sur les organismes marins fournissent des limites de détection/ quantification dans les matrices, comprises entre 5 et 36 µg.kg⁻¹ pour la LD et entre 13 et 120 µg.kg⁻¹ pour la LQ.

Les extraits sont généralement concentrés puis solubilisés dans du MeOH avant l'analyse chromatographique en phase liquide associée à spectrométrie de masse. Les analyses peuvent se faire sur diverses colonnes, bien que les colonnes PolyFluoroPhenyl (PFP), Kinetex-C18^(ND), et Uptisphere C18-TF^(ND) aient été identifiées comme celles permettant la meilleure séparation des différentes ovatoxines (Brissard *et al.*, 2015). Un gradient d'élution de 20 à 100 % d'acétonitrile en milieu acide (0,1% acide formique ou acide acétique) est indiqué (Ciminiello *et al.*, 2012 ; Brissard *et al.*, 2015 ; Ternon *et al.*, 2018) mais une ionisation plus efficace est rapportée en présence de sels de calcium ou de potassium (Ciminiello *et al.*, 2012). Les ovatoxines sont détectées en mode positif, généralement entre *m/z* 200 et 2000. Les types de détecteurs varient selon les études, avec des QToF, des Orbitrap, des triple quadripoles. L'utilisation d'un instrument plutôt qu'un autre est généralement justifié par les objectifs des analyses (recherche ou routine) et la disponibilité des instruments.

9.5.2.2 Méthodes biochimiques et biologiques

Tests immunologiques

Différents types de dosage ELISA ont été utilisés pour l'analyse de PLTX dans un extrait de corail mou, *Palythoa tuberculosa* collecté à Hawaï (Bignami *et al.*, 1992), de PLTX et 42-OH-PLTX dans des moules et des échantillons d'algues et d'eau (recherche de toxines dissoutes) (Boscolo *et al.*, 2013) ou encore pour l'analyse de PLTX et OVTX-a, -d et -e dans des échantillons d'*O. cf. ovata* du Nord de l'Adriatique et dans des moules, *Mytilus galloprovincialis* (Pelín *et al.*, 2016). La spécificité de détection de la PLTX et de ses analogues par les

méthodes ELISA disponibles a été testée en exposant d'autres toxines marines aux anticorps, dont l'acide okadaïque, la yessotoxine, l'acide domoïque, la saxitoxine, la tétrodoxine, la lynbyatoxine A ou encore la brevétoxine-3. Aucune réaction croisée n'a été observée, confirmant la spécificité de détection de l'ELISA (Boscolo *et al.* 2013 ; Bignami *et al.*, 1992). En termes de performances, Boscolo *et al.* (2013) rapportent une répétabilité et une reproductibilité de 6 et 9% respectivement, et des taux de recouvrement des toxines (après dopage) de 95,8 à 98,2% pour les moules, de 95,6 à 105,5% pour les microalgues et de 57,3 à 85,3% pour l'eau de mer (toxines dissoutes). Ces auteurs rapportent également une LQ dans les moules de 11 µg PLTX.kg⁻¹ de chair et une LQ de 9,6 et 2,4 ng. mL⁻¹, respectivement pour les cellules d'*Ostreopsis* et pour l'eau de mer.

L'approche immunologique a été appliquée dans le cadre d'une technologie un peu différente de celle présentée ci-dessus, puisqu'il s'agit de la résonance plasmonique de surface (SPR – *surface plasmon resonance*) (système biosenseur). Cette technique optique permet la détection d'un ligand, ici la PLTX ou ses analogues, se fixant à un récepteur immobilisé sur une surface. Cette technologie a été appliquée à l'analyse de PLTX dans des mérours, des clams, des moules (*Mytilus edulis*), des coques (*Cerastoderma edule*), des huîtres (*Crassostrea gigas*) et des coquilles St-Jacques (*Pecten maximus*) (Campbell *et al.*, 2014 ; Yakes *et al.*, 2011). Le récepteur utilisé, qui est un anticorps monoclonal dirigé contre la PLTX, n'a montré aucune réaction croisée avec d'autres toxines marines (saxitoxine, tétrodoxine, maïtotoxine, pecténotoxine-2, acide okadaïque, dinophysistoxines 1 et 2). En termes de performances de méthode, Campbell *et al.* (2014) ont rapporté une limite de détection pour la PLTX dans les moules de 46 µg PLTX.kg⁻¹ avec un rendement d'extraction supérieur à 80%. Yakes *et al.* (2011) ont estimé les limites de détection dans le tampon seul, et en présence de matrice (10% de mérour ou 10% de palourde) comme étant respectivement de 0,5 µg.mL⁻¹ , 2,8 et 1,4 µg.mL⁻¹.

Tests de cytotoxicité

Test hémolytique

Le test hémolytique repose sur la capacité de la PLTX et de ses analogues à transformer la pompe Na⁺/K⁺ ATPase en un canal non spécifique, ce qui entraîne des réactions en cascade et un déséquilibre ionique se traduisant par une hémolyse retardée des érythrocytes de mammifères. Les érythrocytes de mouton sont ceux qui ont été les plus utilisés pour l'analyse de la PLTX (Aligizaki *et al.*, 2008; Espina *et al.*, 2009; Pezolesi *et al.*, 2012; Riobó *et al.*, 2008; Volpe *et al.*, 2014). Les érythrocytes de souris l'ont été dans une moindre mesure (Bignami *et al.*, 1992 ; Biré *et al.*, 2013 ; Biré *et al.*, 2015). Une publication fait état de l'utilisation d'érythrocytes humains pour l'analyse de la PLTX et OVTX-a, -d et -e dans des cellules d'*O. cf. ovata* du Nord de l'Adriatique et dans des moules, *Mytilus galloprovincialis* (Pelín *et al.*, 2016).

Différents types de matrices ont été analysées par le test hémolytique ; il s'agit aussi bien de corail mou du genre *Palythoa* (Bignami, 1993), de cellules d'*Ostreopsis* épiphyte ou planctonique issues de prélèvements environnementaux ou de culture (Aligizaki *et al.*, 2008 ; Espina *et al.*, 2009 ; Pelín *et al.*, 2016 ; Pezolesi *et al.*, 2012) ou d'organismes marins (Aligizaki *et al.*, 2008 ; Biré *et al.*, 2013 ; Biré *et al.*, 2015 ; Espina *et al.*, 2009 ; Pelín *et al.*, 2016).

Afin de permettre la détection spécifique de la PLTX et de ses éventuels analogues par le test hémolytique, des agents neutralisants tels que l'ouabaïne (activateur des pompes Na⁺/K⁺ ATPases) et l'anticorps monoclonal 73D3 ont été ajoutés à certaines méthodes décrites dans la littérature (Aligizaki *et al.*, 2008 ; Bignami, 1993 ; Biré *et al.*, 2013 ; Biré *et al.*, 2015 ; Pezzolesi *et al.*, 2012). Ces agents ont pour effet de neutraliser de manière spécifique l'action de la toxine et la comparaison des réponses avec et sans agent neutralisant permet de confirmer que l'effet hémolytique observé est bien spécifique de la PLTX et de ses analogues. La spécificité du test hémolytique vis-à-vis d'autres toxines marines (saxitoxines, brevétoxines, tétrodotoxine, acide okadaïque, yessotoxines) a également été vérifiée (Volpe *et al.*, 2014 ; Aligizaki *et al.*, 2008). En matière de performances, Riobo *et al.*, (2008) estiment que le test hémolytique est vingt fois plus sensible que le bioessai sur souris.

La technique de polarisation de la fluorescence présentée par Alfonso *et al.* (2012) repose sur la fixation de la PLTX sur la pompe Na⁺/K⁺ ATPase. Cette technique se base sur l'excitation d'une molécule fluorescente par une lumière polarisée dans le plan et sur la mesure du degré de polarisation de la lumière émise. Ces auteurs ont pu tester cette technique sur des cultures d'*O. siamensis*, *Prorocentrum reticulatum*, et *Lingulodinium polyedrum* pour l'analyse de la PLTX, vérifiant ainsi la spécificité de détection puisqu'aucune réaction croisée n'a été observée avec *P. reticulatum*, et *L. polyedrum*. Concernant les performances de la technique, les limites de détection et de quantification de la PLTX rapportées par ces auteurs sont respectivement de 2 et 10 nM.

Tests cellulaires

Différents types de lignées cellulaires ont été utilisés dans le cadre du développement et de l'utilisation de tests de cytotoxicité pour l'analyse de la PLTX et de ses analogues. Les lignées les plus couramment utilisées sont les neuroblastomes, avec les cellules Neuro-2a et BE(2)-M17 (Cañete et Diogène 2008 ; Espina *et al.*, 2009 ; Ledreux *et al.*, 2009) et dans une moindre mesure les cellules hybrides de neuroblastome et de gliome (Cañete et Diogène, 2008), les hépatocytes (Espina *et al.*, 2009), les cellules humaines d'adénocarcinome du sein (MCF-7) (Bellocci *et al.*, 2008), ou les kératinocytes (HaCaT) (Pelin *et al.*, 2016). Ces lignées cellulaires ont été utilisées pour l'analyse des toxines contenues/associées dans les cellules d'*Ostreopsis* épiphyte ou planctonique à partir de prélèvements environnementaux ou de souches mises en culture (Espina *et al.*, 2009 ; Ledreux *et al.*, 2009 ; Pelin *et al.*, 2016) et dans les organismes aquatiques (moules, oursins) (Bellocci *et al.*, 2008 ; Espina *et al.*, 2009 ; Ledreux *et al.*, 2009 ; Pelin *et al.*, 2016).

Comme pour le test hémolytique, la spécificité de détection de la PLTX et de ses analogues est assurée en pré-traitant les cellules avec de l'ouabaïne (Espina *et al.*, 2009 ; Ledreux *et al.*, 2009 ; Bellocci *et al.*, 2008). Un prétraitement concomitant à l'ouabaïne et à la vératridine permet de jouer sur la sensibilité du test de cytotoxicité et de discriminer la présence d'autres toxines marines (Cañete et Diogène 2008 ; Ledreux *et al.*, 2009). D'après Ledreux *et al.* (2009), le test Neuro-2a permettrait de détecter des teneurs en PLTX dans les coquillages de l'ordre de 50 µg.kg⁻¹.

Nicolas *et al.* (2014) ont utilisé cette approche pour développer un capteur, sous la forme d'un réseau de multi-électrodes, utilisant des cellules corticales néonatales de rat et permettant de détecter, de manière simultanée, plusieurs toxines dont la PLTX.

Bioessai sur souris

Le bioessai sur souris (BES) consiste à injecter par voie intrapéritonéale à des souris de l'extrait à analyser. S'ensuit une période d'observation de 24 h durant laquelle les symptômes observés et le temps de survie des souris sont notés. Pour Riobo *et al.*, 2008, le BES est considéré comme positif si au moins deux des trois souris meurent dans les 24h. Les symptômes observés sont de type neurologique avec initialement l'étirement des pattes arrières et du bas du dos ainsi que la courbure concave de la colonne vertébrale. Ces premiers symptômes qui se manifestent dans le premier quart d'heure après l'injection, ont d'ailleurs été identifiés par Riobo *et al.*, (2008) comme signes de la présence de PLTX car, en présence d'autres toxines neurologiques, les symptômes sont différents. Dans les cas d'intoxication sévère, les souris convulsent, présentent des difficultés respiratoires importantes entraînant la mort par asphyxie. Le BES a été utilisé pour l'analyse des toxines dans des extraits de cellules d'*Ostreopsis* et de coquillages (moules, *M. galloprovincialis* et *Modiolus barbatus*, praires *Venus verrucosa*) (Aligizaki *et al.*, 2008 ; Espina *et al.*, 2009).

Bioessai sur crustacés

Les larves de crustacés sont souvent utilisées en toxicologie environnementale pour évaluer la qualité du milieu. Les bioessais mis en œuvre sont généralement simples et faciles d'utilisation.

Ainsi des bioessais utilisant des larves du crustacé *Artemia salina* ont été mis en œuvre pour l'analyse d'échantillons d'eau et/ou de cellules d'*Ostreopsis* (Faimali *et al.*, 2012 ; Hwang *et al.*, 2013 ; Pezolesi *et al.*, 2012 ; Tartaglione *et al.*, 2016b). Pavaux *et al.* (2020) ont également utilisé *A. franciscana* au stade larvaire afin de tester la toxicité de souches d'*O. cf. ovata* et *O. cf. fattorussoi*, françaises et libanaises, respectivement. Ces auteurs ont également montré que ce bioessai peut être utilisé dans le cadre du suivi d'une prolifération d'*Ostreopsis*.

D'autres crustacés ont été utilisés dans le cadre de bioessais, pour tester la toxicité de cultures de laboratoire d'*O. cf. ovata* ; c'est le cas du copépode *Tigriopus fulvus* et du cirripède *Amphibalanus amphitrite*, qui possède un stade adulte sessile et une série de phases larvaires planctoniques (Faimali *et al.*, 2012, Pavaux *et al.*, 2019).

Autres bioessais

La toxicité de la PLTX a été évaluée dans le cadre d'un test de tératogénotoxicité sur embryon de xénope lisse, *Xenopus laevis* (FETAX, (Franchini, Casarini, et Ottaviani, 2008)). L'exposition des embryons à la PLTX entraîne une mortalité et impacte la croissance et favorise la tératogénèse.

Des juvéniles de bar commun (*Dicentrarchus labrax*) ont également été utilisés dans le cadre d'un bioessai visant à déterminer la toxicité de cultures d'*O. cf. ovata* (Faimali *et al.*, 2012 ; Pezolesi *et al.*, 2012). Le critère de toxicité retenu est la mort des juvéniles, visible avec l'arrêt des mouvements des branchies.

9.5.3 Bilan des méthodes analytiques

Les différentes techniques analytiques rapportées dans la littérature pour l'analyse des toxines du groupe de la PLTX reposent sur des principes de détection différents présentant des avantages et inconvénients. Les techniques physico-chimiques sont tributaires de la disponibilité d'étalons pour les différentes toxines, sachant que pour l'instant seul celui de la PLTX est commercialisé. En revanche les méthodes biochimiques et biologiques sont utilisables avec ce seul étalon.

Les tests immunologiques sont dépendants de la disponibilité des anticorps nécessaires pour la détection des toxines. Les aspects éthiques sont également importants et écartent le bioessai sur souris de la liste des approches analytiques appropriées en routine pour l'analyse des PLTX, au-delà de toute autre considération.

Les méthodes physico-chimiques ont l'avantage de déterminer le profil toxinique des extraits analysés alors que les méthodes biologiques donnent une évaluation globale de la toxicité.

La sensibilité et plus globalement les performances des différentes techniques sont aussi un élément clé et discriminant. Pour autant, il est souvent difficile de s'appuyer sur ces critères car dans bien des articles, les informations sont partielles voire inexistantes et exprimées dans des unités qui ne permettent pas de les comparer (exemple : LD exprimées en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ou en $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de matrice).

Au vu des informations compilées, les quatre techniques qui se démarquent sont l'analyse LC-MS/MS, les tests immunologiques et les tests cellulaires hémolytique et N2a. La spécificité de détection de la LC-MS/MS vient du fait que l'on suive une transition « ion parent → ion fils », spécifique des toxines recherchées, alors que, dans le cas des tests immunologiques type ELISA (non disponible commercialement actuellement), la spécificité de détection est assurée par l'utilisation d'anticorps dirigés contre la/les toxines d'intérêt. Enfin, dans le cas des tests hémolytique et N2a, la spécificité de détection est assurée par l'utilisation d'ouabaïne.

Concernant les performances analytiques des différentes techniques, les LD et les LQ dans les matrices biologiques sont rarement disponibles (Tableau XV).

Tableau XV : Limites de détermination de différentes techniques d'analyse de la PLTX

| Technique | LD et LQ * | Matrice | Référence |
|------------|---|--|----------------------------------|
| LC-UV | LD 1-2 μg | <i>Ostreopsis</i> | Riobo <i>et al.</i> , 2006 |
| LC-FLD | LD 0,75 ng, LQ 2 ng | <i>Ostreopsis</i> | Riobo <i>et al.</i> , 2006 |
| LC-MS(/MS) | LD 7,5 ng et LQ 20 ng | <i>Ostreopsis</i> | Riobo <i>et al.</i> , 2006 |
| | LD 7,4 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ et LQ 24,5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ | Mollusques bivalves, crustacés, poissons | Biré <i>et al.</i> , 2013 & 2015 |

| | | | |
|--------------------|--|---|--|
| | LD : entre 5 et 36 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ et LQ : entre 13 et 120 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ | Mollusques bivalves, crustacés, poissons, oursins, céphalopodes | Tableaux du chapitre « Contamination du milieu » |
| Test immunologique | LQ 11 $\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$ | Moule | Boscolo <i>et al.</i> , 2013 |
| | LD 46 $\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$ | Moule | Campbell <i>et al.</i> , 2014 |
| | LQ 9.6 $\text{ng}.\text{mL}^{-1}$ | <i>Ostreopsis</i> | Boscolo <i>et al.</i> , 2013 |
| | LQ 2,4 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ | Eau de mer | Boscolo <i>et al.</i> , 2013 |
| | LD 0,5 $\text{ng}.\text{mL}^{-1}$ | Tampon | Yakes <i>et al.</i> , 2011 |
| | LD 1,4 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ | Palourde | Yakes <i>et al.</i> , 2011 |
| | LD 2,8 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ | Mérou | Yakes <i>et al.</i> , 2011 |
| Test hémolytique | LD 0,005 ng et LQ 0,008 ng | <i>Ostreopsis</i> | Riobo <i>et al.</i> , 2006 |
| | LD 1,6 $\text{ng}.\text{kg}^{-1}$ | Mollusques bivalves | Aligizaki <i>et al.</i> , 2008 |
| | LQ 1,2 $\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$ | Mollusques bivalves, crustacés, poissons | Biré <i>et al.</i> , 2013 & 2015 |
| N2A | LD 50 $\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$ | Mollusques bivalves | Ledreux <i>et al.</i> , 2009 |
| Souris | nd** | nd | nd |
| Crustacés | nd | nd | nd |

(*) LD et LQ déterminées pour la PLTX ; (**) LD50 souris de 295 ng/kg rapportée par Riobo *et al.* 2008, pour la PLTX. nd : information non disponible.

9.6 Points à retenir

- Il n'existe à ce jour aucun protocole standardisé d'échantillonnage, d'identification et de dénombrement des cellules d'*Ostreopsis* ni de protocole d'analyse du contenu toxinique dans ces dernières mais aussi dans l'eau, les aérosols, ou les organismes marins.
- À l'échelle de la colonne d'eau, la grande variabilité des abondances cellulaires dans le compartiment benthique à une petite échelle spatiale, ainsi que la migration des cellules dans le compartiment planctonique jusqu'à la surface pour former des fleurs d'eau nécessite que le dénombrement des cellules soit réalisé, dans la mesure du possible, pour chacun des trois phases du cycle des cellules.
- Actuellement, seule l'observation microscopique, couplée par les méthodes de comptage normalisées et réalisée par un personnel formé permet l'identification et le dénombrement des genres d'*Ostreopsis*.

10 Réglementations et recommandations en France et à l'international pour la surveillance d'*Ostreopsis* et des toxines associées

Ce chapitre décrit les programmes de surveillance, les recommandations ou réglementations relatifs à la surveillance d'*Ostreopsis* et de ses toxines associées dans les eaux de baignade, l'air et les produits de la mer en France et à l'international. À la suite de la recherche bibliographique issue de journaux à comité de lecture et de la littérature grise, il s'avère que le suivi sanitaire de ces microalgues et des toxines associées ne relève généralement pas de réglementations nationales. De ce fait, les informations et les protocoles de ces suivis ne sont pas facilement accessibles. Les informations rapportées dans ce chapitre ont, pour une grande part, été obtenues directement auprès de scientifiques ou représentants locaux. Le contenu de ce chapitre n'est donc sans doute pas exhaustif.

10.1 Surveillance d'*Ostreopsis* dans les eaux de baignade

10.1.1 En France

À la suite de cas d'intoxication dus à la présence d'*Ostreopsis* au large de Marseille (îles du Frioul) en 2006, la direction générale de la santé (DGS) a mis en œuvre un dispositif de surveillance associant une surveillance épidémiologique et une surveillance environnementale. L'objectif de ce dispositif était de mettre en place une gestion préventive du risque lié à la présence d'*Ostreopsis spp.* sur l'ensemble du pourtour méditerranéen (Pyrénées-Orientales [66], Aude [11], Hérault [34], Gard [30]), Bouches-du-Rhône [13], Var [83], Alpes-Maritimes [06], Haute-Corse [2B] et Corse-du-Sud [2A]) lors des saisons balnéaires 2007 et 2008. Ce dispositif ne concernait que le suivi des cellules d'*Ostreopsis* présentes dans la colonne d'eau et reposait sur un seuil de pré-alerte à 4 000 cell. L⁻¹ d'*Ostreopsis* et un seuil d'alerte à 30 000 cell. L⁻¹ d'*Ostreopsis*. Le dépassement du seuil de pré-alerte conduisait à l'interdiction de la baignade et de la capture et la consommation des produits de la mer, tandis que le seuil d'alerte déclenchait en sus la mise en place d'une cellule d'aide à la décision (CAD) pilotée par la cellule d'intervention en région (CIRE). Ces seuils de gestion, choisis de manière empirique, avaient pour but de prévenir l'apparition de cas groupés dans les populations fréquentant les plages.

À l'issue de la saison balnéaire 2009, au regard du nombre important de réunions de CAD déclenchées sans que des intoxications humaines ne soient signalées, le ministère de la santé a décidé d'alléger le protocole de surveillance et a proposé de nouveaux seuils de pré-alerte et d'alerte pour la saison 2010. En effet, seuls des symptômes bénins (irritations ORL et cutanées, fébricule) avaient été observés chez un nombre assez limité de baigneurs. Par comparaison, les lésions observées en présence de méduses s'avèrent plus sévères et leur fréquence est bien plus importante. Aucun cas d'exposition à des aérosols marins contaminés n'a été rapporté en 2008, probablement à cause d'une météo clémente.

En 2010, un seuil de pré-alerte à 30 000 cellules par litre et un seuil d'alerte à 100 000 cellules par litre ont retenus dans le nouveau protocole de surveillance des eaux de baignade en

Méditerranée mis en place par la DGS (Note de service DGS/EA3/EA4 N°no 2010-238 du 30 juin 2010 relative à la « *surveillance sanitaire et environnementale et aux modalités de gestion des risques sanitaires pour la saison balnéaire 2010, liés à la présence de la microalgue toxique du genre *Ostreopsis* dans les eaux de baignade en Méditerranée et à la contamination par ses toxines des produits de la mer issus de la pêche de loisir* ») (Figure 38). Ce protocole, qui est toujours appliqué sur le pourtour méditerranéen, se décompose en une surveillance visuelle des eaux de baignade et une surveillance systématique des sites de baignade sentinelles.

Pour le suivi des eaux de baignades, les sites sentinelles sont au nombre de deux par département du pourtour méditerranéen français. Ils sont choisis en tenant compte de leur faible profondeur, de la présence de substrat rocheux avec macroalgues et de leur forte fréquentation. Devant le faible nombre de cas d'intoxication sur le pourtour méditerranéen, la surveillance d'*Ostreopsis* se limite ces dernières années uniquement à la région Provence-Alpes-Côte d'Azur.

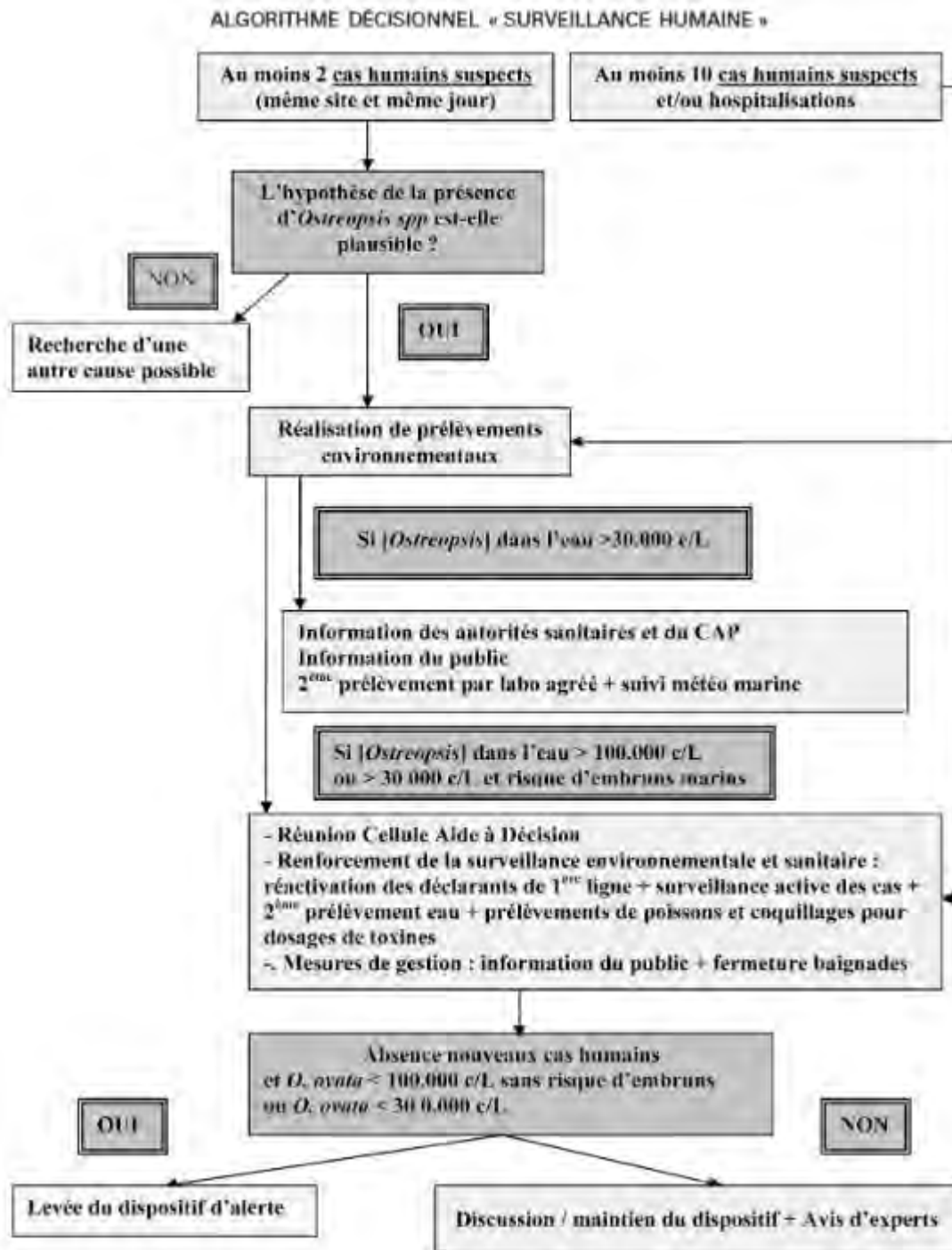


Figure 38 : algorithme décisionnel établi par la Direction Générale de la Santé (DGS) pour la surveillance des eaux de baignade (DGS, 2009 et 2010)

En région Nouvelle-Aquitaine, face au grand nombre de cas d'intoxication dus à *Ostreopsis* sur la côte basque depuis la saison estivale 2020, une surveillance environnementale expérimentale, basée sur le dénombrement des cellules d'*Ostreopsis* dans les compartiments planctonique et benthique, a été mise en place en 2022, en concertation avec la Communauté d'Agglomération du Pays Basque, l'Ifremer et la société Rivage Pro Tech selon le protocole décrit dans le Tableau XVI .

Tableau XVI : stratégie de surveillance mise en place sur la côte basque en 2022

| <i>Ostreopsis</i> spp (cell.L ⁻¹) | Fréquence | Matrice |
|--|--------------|------------------|
| < 1000 | Mensuelle | Macrophyte + eau |
| > 1000 | Bimensuelle | Macrophyte + eau |
| > 10000 ou >1000 + signalement de cas d'intoxication | Hebdomadaire | eau |
| >30000 ou >10000 + signalement de cas d'intoxication | Journalière | eau |

En parallèle, un suivi météorologique et un suivi de l'état de la mer sont effectués tout au long de la saison afin de mieux comprendre les conditions favorisant la prolifération des microalgues.

Pour l'ensemble du territoire métropolitain français, une surveillance épidémiologique sur la base de signalement de cas humains groupés (au moins deux cas- figure 39) aux centres antipoison et de toxicovigilance (CAP-TV) est également réalisée. La définition de cas est la suivante : toute personne en contact direct ou à proximité immédiate de la mer (plage, pêche à la ligne, kayak, etc.), ayant présenté, 2 à 6 h après contact avec de l'eau de mer ou des aérosols, au moins deux des symptômes suivants :

- fièvre (température : 38 °C), frissons, sueurs ;
- pharyngite ;
- toux ;
- troubles respiratoires ;
- céphalées (maux de tête) ;
- nausées (envie de vomir) ;
- rhume (nez bouché et/ou qui coule) ;
- conjonctivite (yeux qui piquent et qui coulent) ;
- vomissements ;
- dermatites.

Le CAP-TV est chargé de la vérification/confirmation du signalement des cas groupés puis transmet l'information à l'ARS compétente sur la zone géographique concernée afin qu'elle réalise rapidement des prélèvements pour vérifier la présence d'*Ostreopsis* dans l'eau de baignade.

10.1.2 Sur le pourtour méditerranéen de l'union européenne

En Italie, il n'existe pas de réglementation nationale relative au suivi des cellules d'*Ostreopsis* dans les eaux de baignade. En revanche, l'Institut Supérieur de la Santé a publié en 2014 des lignes directrices pour la gestion des proliférations d'*Ostreopsis* cf. *ovata* le long des côtes

italiennes⁴³. Ces lignes directrices fournissent des informations permettant la mise en place d'activités de surveillance environnementale, d'un système de surveillance sanitaire et d'un système de communication au public, informations qui sont ensuite complétées par des annexes techniques destinées aux autorités territoriales compétentes (Tableau XVIII).

Des seuils identiques aux seuils réglementaires français actuels ont été proposés (Funari *et al.*, 2015), basés sur les concentrations cellulaires entraînant l'apparition de symptômes respiratoires selon les scénarii d'exposition développés en Italie et combinés avec les conditions environnementales météorologiques et hydrodynamiques (température, vent, agitation de la mer). Même si les valeurs de référence sont basées sur les concentrations cellulaires d'*Ostreopsis* dans l'eau de mer, des prélèvements benthiques sont également réalisés, ce qui permet à l'Italie de disposer désormais d'une base de données très complète.

Tableau XVII : Lignes directrices pour la protection de la santé humaine dans les eaux de baignade affectées par les proliférations d'*O. cf. ovata*).

| Seuil | Densité cellulaire | Conditions environnementales | Risques pour la santé | Activité requise | Mesures de gestion |
|---------|---------------------|---|--|--|---|
| Routine | < 10 000 cell/L | Sans condition météo particulière | Négligeable | Observation visuelle mensuelle et/ou surveillance de routine | Aucune |
| | 10 à 30 000 cell/L | En période prolongée (7 à 10 jours) avec un hydrodynamisme modéré et une température* très inférieure aux températures optimales de formation des efflorescences | Négligeable | | |
| | 10 à 30 000 cell/L | En période prolongée (7 à 10 jours) avec un faible hydrodynamisme (conditions météo défavorables à la formation d'aérosols) et une température* optimale pour la formation des efflorescences | Négligeable | <ul style="list-style-type: none"> - Intensification de la surveillance - Évaluation de l'étendue de la zone affectée - Observation des effets sur les organismes aquatiques (macrofaune benthique) - Analyse chimique des toxines analogues de la PLTX dans l'eau et les produits de la mer - Surveillance de la santé | Information du public visant à prévenir les expositions dangereuses |
| | 30 à 100,000 cell/L | En période sans vent | Présence possible de signes ou symptômes locaux et/ou systémiques légers possibles | | |

⁴³ (DM 30/3/2010) (https://www.iss.it/documents/20126/45616/14_19_web.pdf/b2b3c931-e0a0-b0b4-b40a-f315cf7869a3?t=1581099008345, Funari *et al.*, 2015)

| | | | | | |
|---------|-----------------|--|--|--|---|
| Urgence | >30 000 cell/L | Conditions venteuses (formation d'aérosols) et température optimale pour la formation des efflorescences | Présence possible de symptômes cutanés et/ou respiratoires ou systémiques. | Mêmes mesures de gestion que pour la phase d'Alerte et - analyse des toxines analogues de la PLTX dans les aérosols - En cas de tempête, nettoyage du littoral Interdiction temporaire de la baignade et des autres activités de loisirs pratiquées dans la zone. | Information du public visant à prévenir les expositions dangereuses (affiches, bulletins d'information, signalisation, publications dans les portails nationaux et régionaux ; ordre d'interdiction par le maire) |
| | >100 000 cell/L | Sans conditions météorologiques particulières | Risque d'effets systémiques si ingestion d'eau | | |

(Source Funari *et al.*, 2015)

Cependant, les régions italiennes ayant des compétences élargies, chacune d'elles a mis en place de la surveillance qui lui est propre.

Par exemple, en **mer Adriatique**, depuis l'été 2009, dans le sud de l'Italie et en particulier dans la ville de Molfetta, un suivi régulier des proliférations d'*O. cf. ovata* est réalisé toutes les deux semaines de juin à septembre par l'agence régionale pour la protection de l'environnement (ARPA). Ce suivi a été mis en place par l'ARPA Puglia dans un objectif d'alerter les usagers des plages des risques d'intoxication (Ungaro *et al.*, 2010 ; [ARPA PUGLIA ; https://www.arpa.puglia.it](https://www.arpa.puglia.it)). Les prélèvements sont réalisés dans les compartiments planctonique et benthique. Une approche de science participative qui fait appel à des bénévoles regroupés dans une ONG (Osservatorio del Mare à Molfetta) a contribué également à la surveillance d'*Ostreopsis* en Italie. Pendant cinq ans, des bénévoles ont fait des prélèvements, des comptages de cellules et ils ont également récolté des données météorologiques (De Virgilio *et al.*, 2021).

Dans le cadre de la mission de surveillance de la qualité des eaux de baignade de la direction de l'Environnement de **la Principauté de Monaco**, une surveillance d'*Ostreopsis* a été mise en place depuis 2007. Cette surveillance repose sur un double prélèvement (dans les compartiments planctoniques et benthiques) réalisé de façon hebdomadaire sur la plage du Larvotto en huit points lors de la saison balnéaire. Les résultats sont disponibles sous 48 h et la communication et la gestion du risque, basées sur les seuils réglementaires français des eaux de baignade sont sous la responsabilité de la Direction de l'Environnement de Monaco. Les signalements de cas d'intoxications sont transmis au CAP-TV de Marseille.

En Espagne, le suivi d'*Ostreopsis* dans le compartiment planctonique était inclus traditionnellement dans le cadre des programmes de surveillance du phytoplancton toxique ou nuisible dans les eaux de baignade et/ou les sites d'aquaculture (par exemple, <https://aca.gencat.cat/ca/laigua/sequiment-i-control/protocols/>) tandis que le prélèvement d'*Ostreopsis* dans le compartiment benthique n'était réalisé que dans le cadre de projets de recherche scientifique. Les cas d'intoxication survenus en 2004 dans la localité de Sant Andreu de Llavaneres, Catalogne (Álvarez *et al.*, 2005 ; Vila *et al.*, 2008) et en 2006 à Almería, Andalousie (Barroso *et al.*, 2008) et leur similarité avec les cas signalés en France et en Italie sur la même période, ont conduit les agences de santé et de l'environnement des communautés autonomes à mettre en place des collaborations *ad hoc* avec des laboratoires

de recherche (par exemple, Vila *et al.* 2012). En **Catalogne, sur la côte méditerranéenne**, suite au constat de récurrence des proliférations d'*Ostreopsis*, il a été décidé d'établir des protocoles réguliers de surveillance benthique en coordination avec l'Agence Catalane de l'Eau (ACA) et l'Institut des Sciences de la Mer à Barcelone (ICM-CSIC). Ainsi, depuis 2019, la surveillance d'*Ostreopsis* dans les compartiments benthique et planctonique est réalisée sur vingt plages en Catalogne (Figure 39A) du 15 juin au 15 septembre. La fréquence de prélèvement est bimensuelle, excepte sur cinq plages dont la fréquence devient hebdomadaire car la surveillance des années antérieures a mis en évidence des concentrations cellulaires d'*Ostreopsis* élevées dans la colonne d'eau. D'autres plages sont surveillées en cas de détection de fleurs d'eaux en surface susceptibles d'être causées par *Ostreopsis* et/ou d'irritations respiratoires. Les abondances cellulaires sont classées selon une échelle de couleurs (vert, jaune, orange, rouge) qui correspond aux seuils liés aux risques pour la santé humaine. Ces valeurs, qui tiennent compte des données sur l'exposition à l'*Ostreopsis* dans la zone, sont les mêmes que celles retenues en France et en Italie dans le compartiment planctonique, mais elles comprennent également des seuils pour les prélèvements réalisés dans le compartiment benthique :

- Absence d'*Ostreopsis* : bleu
- Absence de risque (vert) fixé à moins de 30 000 cellules.L⁻¹ d'eau ou à 20 000 cellules.g⁻¹ poids frais (PF) de macroalgue ;
- Seuil de pré-alerte (jaune) fixé à partir de 30 000 cellules.L⁻¹ d'eau ou de 20 000 à 200 000 cellules.g⁻¹ poids frais (PF) de macroalgue ;
- Seuil d'alerte de risque pour la santé (orange) : 30 000 cellules.L⁻¹ à 100 000 cellules.L⁻¹ d'eau ou de 200 000 à 500 000 cellules.g⁻¹ PF ;
- Seuil d'urgence (rouge) : ≥ 100 000 cellules.L⁻¹ d'eau ou ≥ 500 000 cellules.g⁻¹ PF (Funari *et al.*, 2015 ; Giussani *et al.*, 2017 ; Mangialajo *et al.*, 2017).

Le protocole, décrit par Vila *et al.* (2022), peut constituer un système d'alerte précoce (Early Warning System).

Les résultats de la surveillance sont envoyés chaque semaine aux villes pour informer les citoyens sur le risque d'exposition à l'*Ostreopsis*. L'Agence de Santé Publique de Catalogne est aussi informée pour gérer les possibles cas d'affections. Au cours des années de surveillance, des légers effets respiratoires ont été documentés dans une zone rocheuse à Sant Andreu de Llavaneres (Barcelone), un site régulièrement affecté par les proliférations d'*Ostreopsis* (Figure 40B) et occasionnellement et avec très peu de cas, dans trois localités. En ce moment ci, la collaboration entre les Agences de l'Eau et de Santé de la Catalogne, sont en train de travailler pour des protocoles d'actuations conjoints par la prévention des impacts de l'exposition à la microalgue.

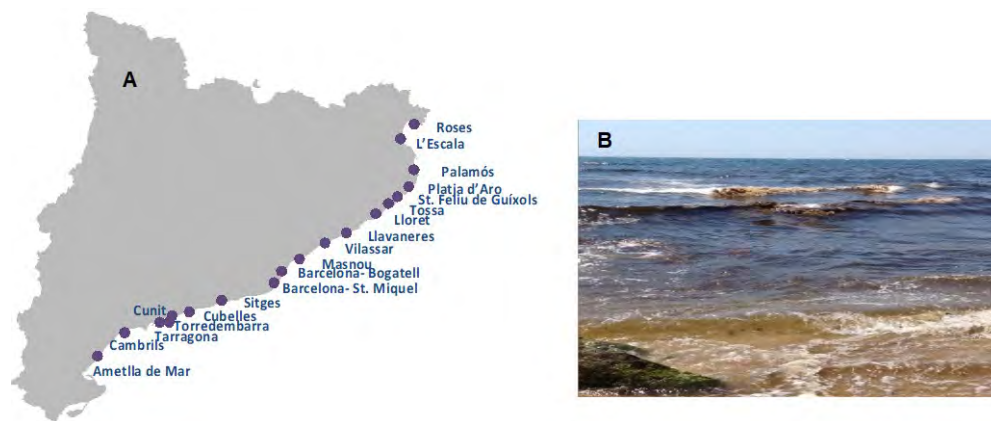


Figure 39 : Carte des stations incluses au plan de surveillance d'*Ostreopsis* en Catalogne après 2019. B Prolifération d'*Ostreopsis cf. ovata* à Sant Andreu de Llavanes, juillet 2014. Source des données : Agence Catalane de l'Eau, Generalitat de Catalunya et Institut de Ciències del Mar-CSIC.

Sur la côte Atlantique de l'Espagne, récemment, suite aux épisodes de proliférations d'*Ostreopsis* survenus sur la côte basque française au cours de l'été 2021, un programme de surveillance a été mis en place au Pays Basque espagnol sur la côte de Guipuscoa. Ce programme prévoit de surveiller à titre expérimental :

- Quatre plages, d'avril 2022 à mars 2024, de façon mensuelle pour analyser les variations saisonnières (pour voir aussi ce qui se passe pendant l'hiver) ;
- Cinq autres plages, uniquement en été, de façon bimensuelle entre le 15 juin et le 15 septembre.

Sur la côte Atlantique de l'Espagne, une surveillance du plancton, comprenant les dinoflagellés, est effectuée dans les eaux de baignade et/ou les sites d'aquaculture. Récemment, suite aux épisodes de proliférations d'*Ostreopsis* survenus sur la côte basque française au cours de l'été 2021, un programme de surveillance a été mis en place au Pays Basque espagnol sur la côte de Guipuscoa. Ce programme prévoit de surveiller à titre expérimental :

- quatre plages, d'avril 2022 à mars 2024, de façon mensuelle pour analyser les variations saisonnières des abondances d'*Ostreopsis* (pour voir aussi ce qui se passe pendant l'hiver) ;
- cinq autres plages, uniquement en été, de façon bimensuelle entre le 15 juin et le 15 septembre.

Aux îles Canaries, l'Observatoire des Algues Nuisibles⁴⁴ assure le service d'alerte précoce sur 80 points de baignade, au sein de l'archipel des Canaries. Un article daté du 16 mai 2022 (Biblioteca de Ciencias Básicas "Carlos Bas") rapporte que la Direction Générale de la Santé Publique du Gouvernement a recommandé au conseil municipal d'Agüimes (Gran Canaria) d'interdire la baignade sur la plage d'Arinaga en raison de la présence en grandes concentrations d'*Ostreopsis cf. ovata* dans ses eaux. Une recherche d'information en ligne sur cet événement n'a pas permis d'obtenir plus de données, ni d'identifier de mesures de surveillance en routine de ces microalgues aux îles Canaries.

⁴⁴ (<https://observatoriocanariohabs.com>, page web en construction)

10.1.3 Autres pays européens

Un questionnaire a été adressé aux membres de l'Endware⁴⁵ afin de recueillir les différentes mesures de gestion mises en place dans les autres pays de l'Union européenne pour surveiller les cellules d'*Ostreopsis* et leurs toxines associées dans les eaux récréatives et les produits de la mer. Les questions posées étaient les suivantes, existe-t-il :

- des réglementations et/ou directives pour le contrôle de la qualité de l'eau, de l'air ou des produits de la mer (crustacés et poissons) ?
- des normes de sécurité, notamment pour les professionnels travaillant à proximité du littoral (sauveteurs, pêcheurs, restaurateurs, etc.) ?
- des guides méthodologiques pour la collecte, l'analyse, la surveillance, etc. (eaux côtières ou aérosols) ?
- une surveillance sanitaire?
- une évaluation des risques sanitaires liés à *Ostreopsis* et à ses toxines dans les produits de la mer, les eaux côtières ou les aérosols?
- des signalements de cas humains associés aux proliférations d'*Ostreopsis*?

Au 1^{er} décembre 2022, huit pays ou région autonome (l'Allemagne, la Bulgarie, la région autonome de Madère, le Danemark, les Pays Bas, le Portugal, l'Italie et la Suède) ont répondu au questionnaire. Hormis le cas de l'Italie déjà décrit plus haut, aucun des autres pays n'a mis en place de contrôle sanitaire réglementaire d'*Ostreopsis* et/ou de ses toxines dans les eaux de baignade ou les produits de la pêche. Les pays ayant répondu n'ont pas été confrontés à cette problématique jusqu'à présent ou seulement de façon ponctuelle et localisée comme au Portugal et dans la région autonome de Madère.

10.2 Surveillance des toxines d'*Ostreopsis* dans les produits de la mer

Aucune réglementation européenne ni internationale relative à la présence de PLTX ou d'autres toxines produites par *Ostreopsis* dans les produits de la mer n'est mise en place actuellement (Dewitte, 2022).

Néanmoins, dans un avis de 2009, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) a estimé à 30 µg.kg⁻¹ de chair de coquillages la concentration maximale à ne pas dépasser pour la somme de la palytoxine (PLTX) et de l'ostrécine-D (OST-D). Cette valeur a été déterminée à partir d'une dose de référence aiguë (ARfD) orale de 0,2 µg.kg pc⁻¹ (EFSA 2009).

En France, en l'absence de seuil réglementaire au niveau européen pour les toxines produites par *Ostreopsis* dans les produits de la mer, et en l'absence de seuil d'alerte dans l'eau (nombre de cellules d'*Ostreopsis* spp. par litre d'eau) à partir duquel il existe un risque alimentaire *via* les produits de la mer, la DGS rappelle, dans la note de service du 30 juin 2010 relative à la surveillance des eaux de baignade pour la saison 2010, qu'en cas de présence de proliférations d'*Ostreopsis*, les mesures de gestion sont les suivantes :

⁴⁵ Endware : réseau européen informel en charge de l'élaboration de réglementations sur l'EDCH de pays membres de l'Union européenne « European Network of Drinking Water Regulator ».

- Recommandation de consommer les poissons issus de la pêche de loisir après éviscération car les toxines se retrouvent principalement dans les viscères ;
- Rappel des interdictions préfectorales de pêcher des oursins sur une période incluant la saison estivale (dates d'interdiction pouvant varier selon la zone, généralement du 1^{er} mai au 31 octobre) sur tout le littoral méditerranéen, les interdictions étant destinées à assurer le renouvellement de l'espèce; à noter l'arrêté préfectoral du 29 septembre 2021 (R93-2021-09-29-00002) élargissant la période d'interdiction dans les départements du Var et des Alpes-Maritimes et pour une durée de trois ans à compter du 1^{er} octobre 2021, interdisant, quel que soit le mode de capture, la pêche des oursins pour les pêcheurs de loisir et les pêcheurs professionnels du 16 avril au 30 novembre.
- Recommandation de ne pas consommer les autres produits de la mer issus de la pêche de loisir.

Les cellules d'*Ostreopsis* sont par ailleurs comptabilisées dans les échantillons d'eau prélevés sur l'ensemble des sites du littoral métropolitain suivis dans le cadre du REPHY.

En outre, de 2008 à 2016, la recherche des toxines du groupe de la PLTX dans les produits de la mer a été réalisée uniquement sur la côte méditerranéenne touchée par les proliférations d'*Ostreopsis cf. ovata*, dans les zones conchylicoles et les zones de pêche professionnelle de coquillages et d'échinodermes. En particulier, durant la période estivale des années 2008-2012, les niveaux d'accumulation des toxines du groupe de la PLTX (pour 90% des OVTX) dans de nombreux échantillons d'oursins ont largement dépassé la valeur guide de l'EFSA de 30 µg (PLTX + OST-D).kg⁻¹ (EFSA, 2009) pendant les proliférations estivales d'*Ostreopsis cf. ovata* (voir chapitre "Contamination"). Bien que (i) la récolte des oursins soit interdite en période estivale et que (ii) les parties comestibles des oursins soient les gonades, une préoccupation sanitaire ne peut pas être exclue. À la demande de la DGAL, l'Ifremer a mis en place, dans le cadre du REPHY, une surveillance systématique des toxines du groupe de la PLTX dans les oursins, en utilisant la méthode d'analyse chimique en LC-MS/MS, durant la période hivernale de pêche (d'octobre à fin mars), de 2009 - 2016, afin de couvrir la période d'autorisation administrative de la pêche d'oursins en Méditerranée sur cinq points : zone de la Côte bleue – Parc marin (42 échantillons), Morgiret-Frioul (40 échantillons), zone des Embiez (42 échantillons), zone des îles de Lérins (26 échantillons), baie d'Ajaccio (32 échantillons).

A l'issue de ces 7 années, aucune identification d'OVTX-a ou PLTX n'ayant été observée, la DGAL décide d'arrêter la surveillance systématique des oursins. Comme la recherche de ces toxines n'est pas réglementée, et relève de la veille de contaminants (ou risque) émergent, le dénombrement d'*Ostreopsis* sera intégré dans le cadre du REPHY, qui assure le suivi de toutes les espèces productrices de toxines. Comme ces toxines ne sont pas réglementées et relèvent de la veille d'émergence, le comptage d'*Ostreopsis* est maintenu dans le cadre du REPHY qui a pour objectif de suivre toutes les espèces toxiques.

Par ailleurs, depuis janvier 2018, les PLTX et d'autres toxines émergentes non réglementées (répertoriées ou non en France) sont recherchées systématiquement chaque mois dans le cadre du réseau EMERGTOX (veille d'émergence des biotoxines marines dans les coquillages) (Figure 40) (Amzil *et al.*, 2021).

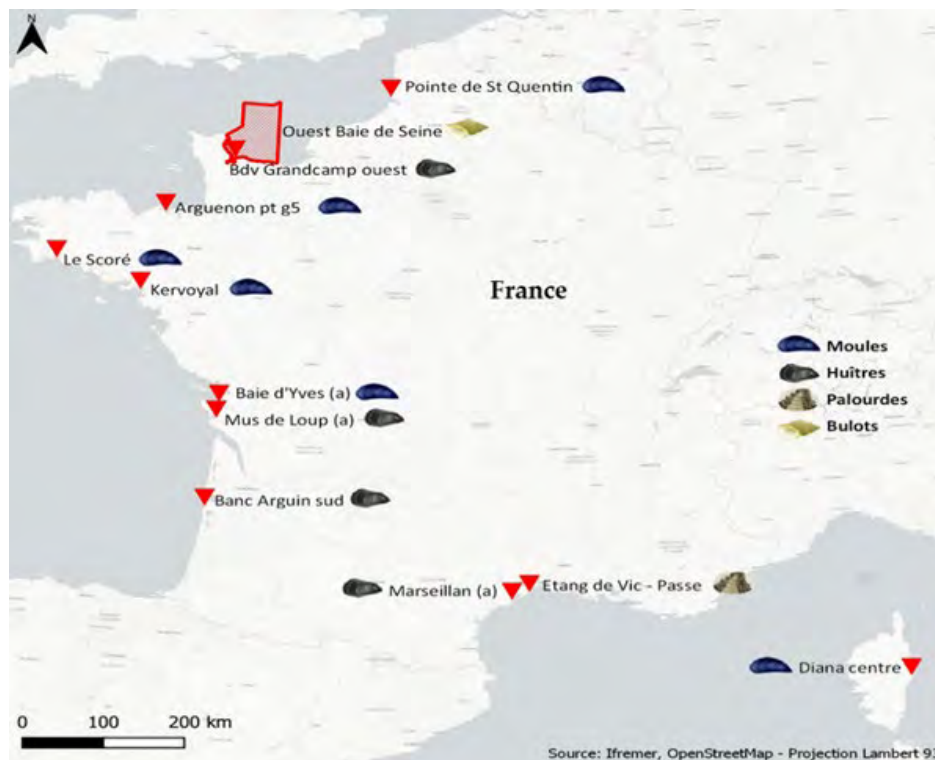


Figure 40 : Carte des douze sites d'échantillonnage de coquillages en France dans le cadre d'EMERGTOX désignés par des triangles rouges. L'espèce de coquillages respectifs étudiée dans ces localités est indiquée par un symbole explicité dans la légende (Amzil *et al.*, 2021)

Au niveau international, la recherche d'information a mis en évidence qu'en Australie, deux provinces (état de Victoria et état de Nouvelle Galles du Sud) ont instauré une vigilance sur des espèces potentiellement toxiques, dont *Ostreopsis cf. siamensis*, dans leur plan de suivi des toxines marines pour les zones conchylicoles. Cependant, aucune réglementation n'existe actuellement et aucun seuil n'a été fixé. Ces plans concernent exclusivement les zones de production conchylicole ou de pêche (Ajani *et al.*, 2017).

Aucune autre surveillance d'*Ostreopsis* ou des toxines associées n'a été identifiée par le GT.

10.3 Points à retenir

- La France est le seul pays à avoir mis en place une surveillance sanitaire et environnementale des eaux de baignade pour le paramètre *Ostreopsis* dans le monde. Il est appliqué actuellement sur des sites sentinelles de la côte méditerranéenne ;
- Il n'existe pas de seuil réglementaire concernant les toxines du groupe de la PLTX dans les produits de la mer au niveau mondial.
- L'EFSA est le seul organisme à avoir recommandé une valeur guide dans les produits de la mer. L'EFSA a estimé à $30 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de chair de coquillages la concentration maximale à ne pas dépasser pour la somme de la palytoxine (PLTX) et de l'ostrécine-D (OST-D).

11 Conclusions du groupe de travail

Ostreopsis est un dinoflagellé benthique qui comprend plusieurs espèces, dont certaines n'ont été que récemment identifiées. Lorsque les conditions environnementales sont favorables à la croissance cellulaire, *Ostreopsis* prolifère généralement dans les zones littorales chaudes et calmes. Ses proliférations sont récurrentes sur les côtes méditerranéennes, italiennes, espagnoles et françaises durant la saison estivale depuis une quinzaine d'années. Les côtes basques françaises et espagnoles constituent ces dernières années une nouvelle zone de développement d'*Ostreopsis*. Deux espèces ont été identifiées sur la côte basque française, *O. cf ovata* et *O. cf siamensis*, tandis que seule *O. cf ovata* est observée sur la côte méditerranéenne française. Ces deux espèces sont très proches morphologiquement, mais une seule d'entre elles, *O. cf. ovata*, est connue pour produire des toxines, principalement des OVTX et dans une moindre mesure l'isob-PLTX.

Au cours de leur vie, les cellules d'*Ostreopsis* occupent différents habitats : elles peuvent être fixées sur des substrats biotiques ou abiotiques dans le compartiment benthique et former des biofilms, ou se trouver dispersées dans la colonne d'eau (compartiment planctonique) ou encore s'accumuler à la surface de l'eau pour former des fleurs d'eau visibles à l'œil nu. La production d'une matrice mucilagineuse (mucus) permet l'agrégation des cellules. Pendant la période de prolifération, les cellules présentes dans le compartiment benthique constituent le réservoir de cellules d'*Ostreopsis*. Différents processus (biologiques ou physiques à l'exemple de la houle et des courants) peuvent provoquer le détachement des biofilms du substrat et leur dispersion dans la colonne d'eau ou leur agrégation en surface.

La voie principale d'exposition de l'Homme est l'inhalation d'aérosols sans que l'on sache actuellement si les agents à l'origine des intoxications sont les cellules d'*Ostreopsis*, les débris cellulaires, des toxines connues produites par *Ostreopsis* ou d'autres composés non encore identifiés. D'autres voies d'exposition (contact cutané, contact oculaire, ingestion d'eau ou de produits de la mer contaminés) sont possibles.

L'exposition à *Ostreopsis* peut conduire à divers signes et symptômes :

- neurosensoriels et neurologiques : paresthésies (sensation de fourmillements), dysesthésies (sensation de brûlure) et céphalées ;
- respiratoires, de la sphère ORL et stomatologiques : dysgueusie à type de goût métallique, rhinorrhée, toux, gêne respiratoire ;
- cutanés évoquant de l'urticaire ;
- cardiaques : tachycardie, poussée hypertensive ;
- digestifs : nausées, vomissements, diarrhée ;
- systémiques : fièvre ;
- locomoteurs : myalgies et arthralgies (douleurs musculaires et articulaires).

Plusieurs situations favorisent les intoxications :

- travail ou activités récréatives dans la mer (baigneurs, maîtres-nageurs, pêcheurs professionnels, surfeurs, etc.) ;
- travail ou activités récréatives sur ou à proximité de la plage (estivants, secouristes, agents en charge du nettoyage des plages, restaurateurs, etc.) ;
- séjour ou résidence à proximité immédiate du bord de mer ;
- consommation des produits de la mer contaminés.

Les premiers cas d'intoxication liés aux proliférations de cellules d'*Ostreopsis* ont été signalés sur la côte basque française et espagnole au cours de l'été 2020. Le bilan épidémiologique montre que 777 personnes ont développé des signes et des symptômes associés aux proliférations d'*Ostreopsis* sur la côte basque française depuis 2020. Ces personnes se sont intoxiquées très majoritairement lors d'une baignade (72 % des cas). Les effets cliniques observés lors de ces épisodes sont similaires à ceux signalés lors des proliférations d'*Ostreopsis* cf. *ovata* du pourtour méditerranéen. Devant l'importance de ce phénomène et le peu de connaissances encore disponibles, les experts proposent dans cette conclusion (i) des recommandations pour améliorer la surveillance d'*Ostreopsis* et mieux prendre en compte les dangers associés à cette microalgue et à ses toxines, (ii) un outil d'aide à la décision pour la gestion des proliférations d'*Ostreopsis* et (iii) des propositions d'études et recherches qu'il faudrait mener pour améliorer les connaissances sur cette microalgue et ses toxines et sur les risques associés à leur présence.

11.1 Recommandations pour la surveillance d'*Ostreopsis* et de ses toxines, ainsi que pour la prévention des dangers liés à ses proliférations

Devant l'absence de certitude que les OVTX produites par *O. cf. ovata* soient à l'origine des intoxications humaines survenues lors des épisodes de prolifération d'*Ostreopsis* sur la côte basque lors des deux derniers étés, le GT « *Ostreopsis* » préconise que la surveillance des proliférations d'*Ostreopsis* se limite au suivi des cellules de cette microalgue, sans que celui-ci ne soit associé, pour l'instant, à un suivi des toxines produites par *Ostreopsis* dans l'eau ou dans les aérosols. Cette surveillance sera quantitative pour les compartiments benthique et planctonique (identification du genre *Ostreopsis* et comptage des cellules) et uniquement qualitative (identification du genre *Ostreopsis*) pour les fleurs d'eau.

Néanmoins, des recommandations ont été formulées pour prévenir l'exposition aux toxines produites par *Ostreopsis*, en tenant compte de toutes les voies d'exposition.

L'ensemble de ces recommandations a été établi à partir des observations, des études menées et des expériences acquises depuis une quinzaine d'années sur le pourtour méditerranéen.

11.1.1 Surveillance d'*Ostreopsis* dans l'eau sur le littoral basque

Stratégie générale de surveillance d'*Ostreopsis*

Une des difficultés inhérentes à la détection des cellules d'*Ostreopsis* est liée à l'hétérogénéité de leur distribution le long du littoral et de leur distribution spatiale et temporelle dans les compartiments benthique et planctonique sur les sites où elles se développent. Ces hétérogénéités nécessitent d'optimiser les protocoles de prélèvements des cellules d'*Ostreopsis* dans ces différents compartiments afin de pouvoir les quantifier de façon fiable et robuste et de proposer des mesures de gestion sanitaires adaptées.

Les observations et les suivis environnementaux ou sanitaires ont montré que les proliférations surviennent en général sur les mêmes sites d'une année à l'autre. Le GT « *Ostreopsis* » recommande donc que le contrôle sanitaire soit mis en place préférentiellement sur les sites

déjà touchés par les proliférations d'*Ostreopsis* sur la côte basque, qu'il s'agisse de plages déjà encadrées par le contrôle sanitaire des eaux de baignade ou de sites de loisirs nautiques qui peuvent être très fréquentés dans cette région tout au long de l'année.

Une campagne d'échantillonnage d'ADN environnemental réalisée en 2019 a montré, la présence de cellules d'*O. cf. siamensis*, en différents points de la côte atlantique française. L'apparition de nouveaux sites de proliférations ne peut donc être exclue, ce qui devrait conduire à l'élargissement de la zone de surveillance dans les années à venir à tout le littoral de la Nouvelle-Aquitaine. Le GT « *Ostreopsis* » recommande en particulier de sélectionner dès à présent, sur la côte atlantique, un ou plusieurs sites de production conchylicole et de pêche à pied susceptibles d'être contaminés, pour être intégrés dans le réseau EMERGTOX.

En parallèle du contrôle sanitaire des eaux de baignade et des sites de loisirs nautiques, l'apparition des situations citées ci-après, au sein ou hors des zones surveillées dans le cadre de ce contrôle, devrait déclencher la réalisation de prélèvements par l'Agence régionale de santé (ARS) pour confirmer la présence d'*Ostreopsis* dans l'eau et sur les macrophytes :

- l'observation visuelle de fleurs d'eau en surface ;
- le signalement de cas d'intoxications humaines et/ou d'une sensation de goût métallique sans que la personne ne soit nécessairement entrée en contact avec de l'eau de mer.

Période de mise en place de la surveillance d'*Ostreopsis*

La période de surveillance d'*Ostreopsis* préconisée actuellement dans le cadre du contrôle sanitaire des eaux de baignade en Méditerranée est celle du suivi des eaux de baignade (15 juin - 15 septembre). Or, le réchauffement des mers et des océans (lié aux changements climatiques) semble être un facteur favorisant la précocité des proliférations d'*Ostreopsis*, qui apparaissent de plus en plus tôt, dès la fin du printemps sur les côtes françaises méditerranéennes. Il a été démontré en Méditerranée que la date de début des proliférations d'*Ostreopsis* est dépendante de la somme des anomalies de la température de surface de l'eau de mer au printemps (plus le printemps est chaud, plus la température de l'eau de surface est chaude et plus les proliférations d'*Ostreopsis* sont précoces).

En attendant de disposer de données similaires sur la côte basque, le GT « *Ostreopsis* » recommande, de démarrer le contrôle sanitaire d'*Ostreopsis* à partir du 15 mai. La fréquence d'échantillonnage sera adaptée en fonction des abondances d'*Ostreopsis* mesurées, en suivant le logigramme proposé par le GT « *Ostreopsis* ».

Stratégie d'échantillonnage d'*Ostreopsis* pour le contrôle sanitaire

Sachant que le développement des proliférations d'*Ostreopsis* se fait dans un premier temps au niveau du compartiment benthique puis dans la colonne d'eau, **le GT « *Ostreopsis* » préconise de surveiller l'abondance d'*Ostreopsis* sur les macrophytes, en sus de l'évaluation des abondances d'*Ostreopsis* dans l'eau effectuée dans le cadre du contrôle sanitaire des eaux de baignade.**

Par ailleurs, de fortes variations diurnes des abondances cellulaires ont été mises en évidence sur le pourtour méditerranéen, aussi bien dans les compartiments benthique et planctonique, qu'en surface de la colonne d'eau. Les abondances cellulaires sont plus importantes le matin dans le compartiment benthique, et en fin d'après-midi dans le compartiment planctonique et

les fleurs d'eau. En 2022, des variations similaires ont été observées sur la côte basque. Cependant, **dans l'attente de la confirmation d'une même dynamique « colonne d'eau-substrat benthique » sur la côte basque, le GT « *Ostreopsis* » recommande de privilégier les prélèvements en fin d'après-midi, afin d'optimiser l'estimation des abondances planctoniques.** Si une dynamique verticale similaire à celle observée en Méditerranée est confirmée, le GT « *Ostreopsis* » recommande de réaliser, dans la mesure du possible, les prélèvements dans les deux compartiments (planctonique et benthique) aux tranches horaires correspondant aux abondances cellulaires maximales (en Méditerranée : 8h à 10h pour le compartiment benthique, et 16h à 18h pour le compartiment planctonique).

Prélèvements et conservation des cellules d'*Ostreopsis* planctoniques et des fleurs d'eau

En l'absence de méthode normalisée pour prélever les cellules d'*Ostreopsis* dans le compartiment planctonique et dans l'objectif d'une harmonisation des pratiques de prélèvement, le GT « *Ostreopsis* » préconise le prélèvement d'un échantillon composite dans la zone de baignade et sur les lieux de pratique d'activités nautiques. Cet échantillon correspond, pour une zone d'environ un mètre de profondeur, au mélange d'échantillons d'eau prélevés en trois points au minimum, régulièrement répartis dans la zone suivie. En chaque point d'échantillonnage, le prélèvement doit être réalisé entre la surface et 20 à 50 cm de profondeur de la colonne d'eau. Ces prélèvements peuvent se faire à pied. Les trois prélèvements sont mélangés, à volumes égaux, dans un récipient de type seau (préalablement rincé trois fois avec l'eau du milieu) dans lequel sera ensuite prélevé l'échantillon à analyser. La prise d'échantillon doit se faire immédiatement après l'homogénéisation du contenu du seau. Cet échantillon servira à l'identification et au dénombrement des cellules d'*Ostreopsis*.

Dans un objectif d'optimisation et d'harmonisation des pratiques de prélèvement, le GT « *Ostreopsis* » recommande d'utiliser des flacons en plastique d'une contenance de 250 mL au minimum pour recueillir l'échantillon destiné à l'identification et au dénombrement des *Ostreopsis*. Ils seront remplis aux deux-tiers pour permettre un bon mélange par agitation. L'échantillon devra être ensuite fixé au lugol acide (1% volume/volume) dans l'heure qui suit le prélèvement puis stocké à l'abri de la lumière à température ambiante jusqu'à analyse.

Les fleurs d'eau peuvent s'accumuler à des distances plus ou moins importantes des zones de production benthiques d'*Ostreopsis*, en fonction de l'orientation et de l'intensité des courants et des vents. Elles seront donc à rechercher préférentiellement dans les zones où des déchets ou des organismes marins planctoniques (comme les méduses) sont souvent retrouvés en quantités importantes sous l'effet de ces mêmes vents et courants. Actuellement, aucune méthode n'a été développée pour estimer la surface impactée, le nombre et la taille des agrégats. Ainsi, en cas de présence de fleurs d'eau, même éloignée d'un site de baignade ou d'activités de loisirs nautiques ou de zones conchylicoles, le GT « *Ostreopsis* » recommande de réaliser un prélèvement de ces agrégats avec de l'eau environnante à l'aide d'un sac plastique ou de flacons en plastique à large ouverture pour faciliter la récolte. Le prélèvement devra être fixé au lugol acide (1% volume/volume) puis stocké dans un contenant isotherme à l'abri de la lumière et à température ambiante en attendant son analyse.

Prélèvement et conservation des cellules d'*Ostreopsis* benthiques

Comme pour le compartiment planctonique, il n'existe pas de méthode normalisée pour prélever les cellules d'*Ostreopsis* sur des substrats benthiques ni d'approche permettant d'estimer l'étendue de la zone couverte par les biofilms d'*Ostreopsis* sur les divers substrats

des sites suivis. Cependant, la méthode de dénombrement des cellules d'*Ostreopsis* associées au benthos la plus couramment utilisée consiste à dénombrer les cellules d'*Ostreopsis* présentes sur des macrophytes et de les rapporter à une unité de poids frais de macrophytes échantillonnés.

Dans l'attente d'une approche qui permettrait d'estimer l'étendue de la zone couverte par les biofilms d'*Ostreopsis* sur les sites suivis et leurs divers substrats, il est recommandé par le GT « *Ostreopsis* » de poursuivre les dénombrements sur les macrophytes. Comme pour l'échantillonnage des cellules dans le compartiment planctonique, le GT « *Ostreopsis* » recommande de réaliser trois prélèvements de cellules d'*Ostreopsis* sur des substrats situés à 50 cm de profondeur et régulièrement répartis dans la zone faisant l'objet du contrôle sanitaire. Les macrophytes seront échantillonnés avec l'eau de mer environnante dans un flacon en plastique de 250 mL sachant qu'il est préconisé de récolter entre 5 et 10 g (masse humide) de macrophytes par échantillon. Les échantillons (eau + macrophyte) seront fixés sur place au lugol acide (1% volume/volume) et stockés à l'abri de la lumière et à température ambiante dans un contenant isotherme. Le dénombrement des cellules d'*Ostreopsis* sera réalisé sur chacun des trois échantillons et c'est la valeur d'abondance la plus élevée qui sera retenue pour le contrôle sanitaire.

Identification et comptage des cellules d'*Ostreopsis*

Le GT « *Ostreopsis* » préconise que les comptages de cellules d'*Ostreopsis* dans les échantillons prélevés dans les compartiments benthique et planctonique soient effectués par la méthode Utermöhl à l'aide d'un microscope inversé ou en utilisant des lames calibrées de 1 mL (ex : Sedgewick Rafter) lorsque la méthode Utermöhl n'est plus adaptée en raison de fortes abondances cellulaires. Les lames calibrées de 1 mL s'observent généralement avec un microscope droit, mais l'utilisation d'un microscope inversé est possible. Pour les deux méthodes, un minimum de 200 à 400 cellules d'*Ostreopsis* devra être compté, lorsque les abondances cellulaires le permettent, afin d'avoir un intervalle de confiance des comptages de 14% et 10%, respectivement.

La reconnaissance du genre *Ostreopsis* se fait relativement facilement en microscopie optique, grâce à la forme des cellules (lentille). En revanche, il n'est pas possible de différencier les espèces *O. cf. ovata* de *O. cf. siamensis* par cette méthode. **Devant l'absence de méthode fiable et rapide permettant de distinguer *O. cf. ovata* et *O. cf. siamensis*, le GT « *Ostreopsis* » recommande de limiter l'identification au niveau du genre des cellules d'*Ostreopsis* dans les différents compartiments (benthique, planctonique, fleurs d'eau).**

Le GT « *Ostreopsis* » recommande que les résultats d'identification et de dénombrement des cellules d'*Ostreopsis* dans les échantillons prélevés soient rendus dans un délai maximum de 48h pour améliorer la gestion des proliférations.

Dans tous les cas, l'identification des cellules d'*Ostreopsis* à l'échelle du genre et leur dénombrement sont des étapes délicates qui nécessitent du personnel formé. Le GT « *Ostreopsis* » recommande donc que les opérateurs de laboratoire soient formés afin de pouvoir identifier et dénombrer facilement les cellules d'*Ostreopsis*.

11.1.2 Surveillance des *Ostreopsis* dans les aérosols

En l'absence de connaissances suffisantes relatives à la nature des composés toxiques et des processus à l'origine de leur transfert vers l'atmosphère, les experts du GT « *Ostreopsis* » ne recommandent pas, pour l'instant, la mise en place d'un contrôle sanitaire des aérosols.

11.1.3 Surveillance des produits de la mer

Les voies d'exposition principales aux toxines du groupe de la PLTX sont l'inhalation d'aérosols et, dans une moindre mesure, le contact avec l'eau de mer contaminée. De rares cas d'intoxications humaines ont également été associés à la consommation de produits de la mer contaminés, aux Philippines et à Madagascar, avec des crabes ou des poissons. Cependant, les méthodes analytiques utilisées ne permettent pas de les attribuer de manière certaine à la présence de toxines du groupe de la PLTX produites par *Ostreopsis* spp. En Méditerranée, les toxines d'*Ostreopsis* ont été retrouvées dans des poissons, des crustacés et des mollusques. Le GT « *Ostreopsis* » estime qu'il n'est pas possible d'exclure le risque d'exposition par voie orale lié à la consommation de produits de la mer contaminés par des toxines du groupe de la PLTX, surtout pour les organismes consommés non éviscérés.

Le GT « *Ostreopsis* » recommande de mettre en place au niveau national un cahier de prescriptions décrivant la stratégie de prélèvement de coquillages dans les zones conchylicoles touchées par une prolifération d'*Ostreopsis*, ainsi que l'approche analytique à utiliser pour l'identification et la quantification des toxines impliquées. L'analyse des prélèvements réalisées selon ce cahier de prescriptions constituera un outil d'aide à la décision pour les gestionnaires, comme c'est le cas pour les toxines faisant déjà l'objet d'une recommandation (cahier de prescription REPHYTOX).

En plus du suivi des mollusques bivalves, il conviendra d'évaluer la contamination d'autres produits de la mer collectés dans une zone impactée par une prolifération d'*Ostreopsis* (céphalopodes, crustacés, gastéropodes, oursins, poissons, algues destinées à la consommation humaine). Il conviendra aussi d'étudier la possibilité d'utiliser les oursins (gonades et chair restante) comme organisme sentinelle pour la détection de la contamination des produits de la mer par des toxines du groupe de la PLTX.

11.1.4 Proposition de valeur guide en toxines produites par *Ostreopsis*

Compte tenu de l'absence de connaissance sur le ou les composés à l'origine des intoxications humaines signalées lors des épisodes de prolifération d'*Ostreopsis* sur la côte basque, le GT « *Ostreopsis* » ne propose pas de valeur guide pour les toxines produites par *Ostreopsis* dans l'eau ou dans les aérosols.

Pour les coquillages, à partir de la VTR aiguë par voie orale de 0,08 µg PLTX.kg⁻¹ pc, en considérant une taille de portion par défaut de 400 g de chair de mollusques bivalves et un poids corporel par défaut de 70 kg, le GT « *Ostreopsis* » et le CES ERCA recommandent **une valeur guide de 15 µg eq. PLTX.kg⁻¹ de chair de coquillages** (corps entier ou dans toute partie comestible séparément), **pour la somme PLTX + OVTX + OST-D** (somme massique non pondérée).

En cas de dépassement de cette valeur guide dans les coquillages, le GT « *Ostreopsis* » recommande :

- de ne pas consommer de coquillages issus de la zone impactée par la prolifération (récolte professionnelle et de loisir) ;
- d'acquérir des données complémentaires sur la contamination des coquillages dans la zone impactée par la prolifération (pour l'espèce pour laquelle le dépassement a été observé et pour d'autres espèces exploitées et/ou consommées sur la zone).

Pour les produits de la mer autres que les coquillages collectés dans une zone impactée par une prolifération d'*Ostreopsis* (céphalopodes, crustacés, oursins, poissons, algues destinées à la consommation humaine) et en l'état actuel des connaissances, le GT « *Ostreopsis* » et le CES « ERCA » ne recommandent pas de valeur guide pour les toxines du groupe de la PLTX. Le GT « *Ostreopsis* » attire l'attention sur le besoin d'acquérir des données de contamination en France pour juger de l'opportunité de proposer une valeur guide à l'avenir. Par ailleurs, lors des épisodes de proliférations d'*Ostreopsis*, **le GT « *Ostreopsis* » recommande que les poissons pêchés dans la zone impactée par la prolifération soient systématiquement éviscérés avant consommation et avant congélation. Les petits poissons ne doivent pas être consommés entiers.**

Pour les oursins, les toxines du groupe de la PLTX se retrouvent également préférentiellement dans les viscères, qui ne sont normalement pas consommés. Le GT « *Ostreopsis* » recommande d'informer les consommateurs d'oursins de ne pas consommer les viscères et de respecter l'interdiction de pêche estivale lorsqu'elle existe.

Enfin, dans les zones impactées par une prolifération d'*Ostreopsis*, le GT « *Ostreopsis* » recommande de ne pas récolter les macroalgues pendant toute la durée de l'épisode.

11.1.5 Recommandations pour la détection et quantification des toxines

Il existe dans la littérature de nombreux protocoles pour l'extraction et l'analyse des toxines du groupe de la PLTX, mais aucun n'est standardisé, que ce soit pour les cellules de microalgues, l'eau de mer, les aérosols ou les organismes marins. Les approches analytiques mises en œuvre sont de nature chimique ou biologique. Les méthodes les plus adaptées à l'analyse des toxines produites par *Ostreopsis*, en fonction de leurs performances et de leur spécificité, sont la LC-MS/MS ainsi que les tests biologiques : tests immunologiques (ELISA) ou cellulaires (Neuro-2a et hémolytique). Si la LC-MS/MS permet de déterminer le profil toxinique de l'extrait analysé, elle pourrait être utilisée conjointement avec l'un des trois tests biologiques, dans la mesure où ils permettent d'appréhender la diversité des toxines présentes, même en l'absence d'étalons. Les résultats sont alors exprimés en eq. PLTX.

Pour les toxines qui ne sont pas du groupe de la PLTX, le GT « *Ostreopsis* » n'a pas identifié de méthode analytique pouvant être mise en œuvre à l'heure actuelle.

Pour les coquillages, **le GT « *Ostreopsis* » recommande de poursuivre l'optimisation des méthodes d'analyse chimiques ciblées comme la LC-MS/MS couplée à la détection par spectrométrie d'absorption moléculaire** (dans l'ultraviolet, UV) en intégrant, en plus de la PLTX, l'ensemble des toxines du groupe de la PLTX et en se basant, à défaut d'étalon, sur leurs masses moléculaires et leurs maxima d'absorption UV. **La méthode développée devra être suffisamment sensible afin d'être en cohérence avec la valeur guide proposée pour les coquillages (15 µg eq PLTX.kg⁻¹).**

Le GT « *Ostreopsis* » recommande également de développer un test biologique pour la recherche de toxines du groupe de la PLTX non pris en compte par l'analyse ciblée par LC-MS/MS. Dès que des étalons des toxines du groupe de la PLTX seront disponibles, le couple d'approches devra être validé, avant de considérer son entrée dans un processus de normalisation.

En cas de non concordance des résultats de ce couple d'approches (sous-estimation par l'analyse chimique ciblée), le GT « *Ostreopsis* » recommande d'avoir recours ultérieurement à une analyse non ciblée en utilisant la spectrométrie de masse haute résolution (LC-HRMS) afin d'acquérir des éléments physico-chimiques sur d'éventuels nouveaux métabolites non détectés par analyse ciblée mais pris en compte par le test biologique (formule brute, données spectrales, etc.).

11.1.6 Recommandations pour limiter l'exposition des professionnels et des riverains sur la côte basque

Les professionnels représentent une population particulièrement touchée par la présence des proliférations d'*Ostreopsis*, qu'il s'agisse des maîtres-nageurs sauveteurs, du personnel encadrant les activités de loisir, des personnes en charge des prélèvements (ci-après nommés préleveurs), ou des commerçants ayant une activité en bordure de plage. L'analyse des cas d'intoxications signalés les deux derniers étés (2021 et 2022) sur la côte basque suggère une aggravation et une durée prolongée des symptômes chez les professionnels d'une année à l'autre. En Espagne et en France, des cas d'intoxications ont également été signalés chez des riverains exposés aux aérosols lors des épisodes de proliférations d'*Ostreopsis*.

Le GT « *Ostreopsis* » souligne l'importance de diffuser auprès des professionnels, dès la saison balnéaire 2023, des messages d'information relatifs aux risques liés aux proliférations d'*Ostreopsis*. En outre, le GT « *Ostreopsis* » recommande un suivi médical spécifique des riverains et des professionnels travaillant sur ou à proximité immédiate des sites touchés par les proliférations d'*Ostreopsis*, qu'il s'agisse de personnels permanents ou saisonniers, pour des expositions aiguës ou répétées. Pour les travailleurs indépendants, il est possible de demander une consultation médicale auprès de leur caisse d'assurance maladie. En complément, un bilan saisonnier des cas d'intoxication chez les riverains des sites touchés par les proliférations d'*Ostreopsis* permettrait de recueillir des informations sur leur exposition.

Par ailleurs, afin de construire un plan d'action et de prévention pour les professionnels vis-à-vis de l'exposition aux *Ostreopsis*, le GT « *Ostreopsis* » recommande également de procéder à une évaluation des risques pour chaque poste potentiellement exposé, notamment en prenant en compte l'inhalation de toxines (obligation selon l'Article L4121-2 du code du travail). Pour le risque spécifiquement lié à l'inhalation d'aérosols, l'exposition journalière des professionnels stationnant sur ou à proximité de la plage contaminée pourrait être suivie et évaluée grâce aux méthodes d'échantillonnage utilisées pour collecter les aérosols contenant des brévétotoxines. Les résultats de ces prélèvements pourraient permettre à terme de définir des seuils de toxicité des aérosols produits lors de proliférations d'*Ostreopsis*.

Dans l'attente des résultats de ces études, et afin de limiter l'exposition des professionnels, le GT « *Ostreopsis* » rappelle que, selon l'article L. 230-2 du code du travail. – « L'employeur prend les mesures nécessaires pour assurer la sécurité et protéger la santé des travailleurs de l'établissement, y compris les travailleurs temporaires. ». Pour cela, le GT « *Ostreopsis* »

propose que soit mis à disposition des travailleurs des équipements de protection individuelle spécifiques en fonction des tâches à réaliser, notamment, pour les préleveurs, le port de gants, de chaussures adaptées et d'une combinaison de plongée. Après la session de prélèvements, les équipements de protection devront faire l'objet d'un rinçage à l'eau douce. Le GT « *Ostreopsis* » recommande également que les préleveurs prennent une douche savonnée à l'eau douce après avoir effectué les prélèvements.

Pour les postes dont le port d'EPI de façon prolongée semble inapproprié (ex : les maitres-nageurs et les personnes encadrant des activités de loisirs sur les sites touchés par les proliférations), dès qu'une prolifération est signalée, le GT « *Ostreopsis* » préconise une réduction de la durée d'exposition aux aérosols en adaptant la durée de travail.

Dans tous les cas, en début de saison estivale, les employeurs doivent rappeler les mesures préventives spécifiques suivantes :

- assurer une formation particulière à l'hygiène et notamment au lavage des mains (risque de manuportage à la bouche et aux muqueuses du visage) ;
- mettre à disposition des douches et des lavabos en nombre suffisant, ainsi que du savon (savon liquide de préférence, en distributeur à commande au coude) et des essuie-mains jetables ou des sèche-mains à air chaud ;
- fournir aux travailleurs qui ne peuvent avoir accès à des installations sanitaires, des moyens de nettoyage sans eau (mousse, gel liquide ou lingettes), à séchage rapide ou des conteneurs d'eau potable et du savon ;
- demander à ce que toute blessure soit immédiatement nettoyée et recouverte d'un pansement imperméable avant de reprendre ou de débiter le travail et fournir le matériel nécessaire ;
- informer son personnel de recouvrir toute plaie cutanée sur peau dénudée avec un pansement imperméable, avant de débiter le travail, et fournir le matériel nécessaire.

Dans les zones concernées par les proliférations d'*Ostreopsis*, le GT « *Ostreopsis* » recommande que les médecins du travail soient formés aux risques liés à l'exposition aiguë ou répétée à *Ostreopsis*. Par ailleurs, devant la possibilité d'extension des proliférations d'*Ostreopsis* vers les zones conchylicoles des côtes de la Nouvelle-Aquitaine, le GT « *Ostreopsis* » préconise que d'ores et déjà des messages d'information sur les risques liés aux proliférations d'*Ostreopsis* soient communiqués aux personnels du secteur de production conchylicole (pêcheurs, travailleurs des sites de production conchylicole ou de pêche) ainsi qu'aux algoculteurs.

11.2 Outil d'aide à la décision pour la gestion des proliférations d'*Ostreopsis* sur la côte basque

Les proliférations de cellules d'*Ostreopsis* sont des phénomènes évolutifs et très dynamiques. Les facteurs et processus qui les régulent sont actuellement mal connus ce qui rend ces phénomènes difficilement prévisibles. Devant l'ampleur du phénomène sur la côte basque, le GT « *Ostreopsis* » recommande la mise en place d'un suivi sanitaire des sites touchés par les proliférations de cellules d'*Ostreopsis*, qu'il s'agisse de sites de baignade surveillés ou de sites de pratique d'activités nautiques qui ne rentrent pas actuellement dans le champ du contrôle

sanitaire des eaux de baignade. En effet, dans ces zones, les activités impliquant une immersion même ponctuelle de la tête, ou bien un contact cutané et/ou oculaire étroit et prolongé (selon les pratiques : planche à voile, paddle, surf, plongée, apnée) peuvent conduire à une exposition par ingestion par voie buccale ou par voie nasale.

Pour aider les collectivités concernées par cette problématique, le GT « *Ostreopsis* » propose une stratégie de surveillance et de contrôle sanitaire (Figure 41) basée sur une collaboration entre le gestionnaire du site et les ARS, applicable sur les sites actuellement encadrés par le contrôle sanitaire des eaux de baignade ainsi que sur les sites de pratique de loisirs nautiques qui répondent aux conditions ci-après.

En premier lieu, le GT recommande la mise en place d'un **contrôle sanitaire** des sites connus pour héberger des proliférations d'*Ostreopsis* qui devra être réalisé *a minima* pendant la période estivale (15 mai-15 septembre). Il sera basé sur le prélèvement d'eau, de macrophytes et de fleurs d'eau si elles sont présentes.

En parallèle du contrôle sanitaire et même hors période estivale, le signalement de cas d'intoxication par une structure médicale devra déclencher un prélèvement d'eau, de macrophytes et de fleurs d'eau si elles sont présentes.

En plus du contrôle sanitaire, un **suivi visuel quotidien** des sites dès la fin du printemps devra être réalisé afin de repérer, en temps réel, la présence de fleurs d'eau, des changements dans la couleur de l'eau ou encore la perception d'un goût métallique dans la bouche, qui sont tous des indicateurs potentiels de la présence d'une prolifération d'*Ostreopsis*. Ces phénomènes déclencheront un prélèvement d'eau et de macrophytes pour analyse. Ce suivi sensoriel pourra être réalisé par des professionnels travaillant sur le littoral ou dans le cadre de programmes organisés de surveillance participative.

La présence d'*Ostreopsis* dans au moins un des compartiments (benthique ou planctonique) devra conduire au dénombrement des cellules. Les résultats de comptages des cellules d'*Ostreopsis* définissent trois niveaux d'alerte différents. Les seuils d'abondances cellulaires choisis pour définir ces niveaux d'alerte (pour le compartiment planctonique) sont les mêmes que ceux appliqués actuellement sur la côte méditerranéenne que ce soit en France, en Italie ou en Espagne. Les seuils d'alerte pour l'abondance des cellules d'*Ostreopsis* dans le compartiment benthique ont été définis à partir de retours d'expérience de suivis réalisés sur la côte méditerranéenne. Ils pourront être réévalués pour la côte basque à l'issue des prochaines saisons estivales.

L'Alerte 1 est déclenchée lorsque les abondances des cellules d'*Ostreopsis* sont inférieures à 30 000 cell.L⁻¹ dans l'eau et à 200 000 cell.g⁻¹ PF sur les macrophytes et/ou quand un cas d'intoxication humaine est signalé. Ce niveau d'alerte permet de maintenir à la normale les activités. Le renouvellement des prélèvements est réalisé de façon bimensuelle dans le cadre du contrôle sanitaire des eaux de baignade. Cependant, si des seuils de 10 000 cell.L⁻¹ d'eau ou 20 000 cell.g⁻¹ PF par macrophyte sont dépassés (tout en étant inférieurs à 30 000 cell.L⁻¹ et 200 000 cell.g⁻¹ PF, respectivement), il est conseillé d'informer le gestionnaire du site d'un risque de proliférations et de renouveler les prélèvements à une fréquence hebdomadaire pour de nouveaux comptages.

L'Alerte 2 est déclenchée lorsque les abondances de cellules d'*Ostreopsis* sont comprises entre 30 000 et 100 000 cell.L⁻¹ dans l'eau ou entre 200 000 et 500 000 cell.g⁻¹ PF sur les macrophytes et/ou lorsque le nombre de cas d'intoxications humaines signalés sur un même

site pendant 48h est compris entre deux et neuf. Ce niveau d'alerte conduit à la mise en place des mesures de gestion suivantes :

- la population est informée du danger en particulier les populations à risque (patients ayant des antécédents de problèmes respiratoires) ;
- la pratique de la baignade et /ou des activités de loisirs sur ou à proximité du site contaminé est déconseillée pour les populations à risque ;
- le poste de travail des professionnels travaillant sur ou à proximité de la plage doit être adapté en fonction des préconisations de la médecine du travail.

À ce niveau d'alerte, des prélèvements d'eau et de macrophytes doivent être réalisés de façon bihebdomadaire afin de suivre la dynamique des proliférations.

L'**Alerte 3** est déclenchée lorsque les abondances de cellules d'*Ostreopsis* sont supérieures à 100 000 cell.L⁻¹ dans l'eau ou à 500 000 cell.g⁻¹ PF sur les macrophytes, et/ou lorsqu'au minimum 10 cas intoxications humaines sont signalés sur un même site pendant 48h. En plus des recommandations faites dans le niveau d'alerte 2 en termes d'information et de protection des professionnels, le niveau d'alerte 3 conduit à la fermeture de la plage et à l'interdiction de la pratique des activités de loisirs sur ou à proximité de la plage où les proliférations d'*Ostreopsis* ont été observées.

À ce niveau d'alerte, un prélèvement journalier d'eau et de macrophytes permettra un suivi de l'évolution des proliférations, afin de réautoriser l'accès à la plage et la pratique des activités nautiques dès que les abondances cellulaires d'*Ostreopsis* seront inférieures aux seuils fixés pour l'alerte 2.

Les messages de prévention prévus pour l'alerte 2, préciseront qu'une douche doit être prise avec de l'eau douce après la baignade ou toute autre activité nautique, et qu'une consultation médicale est recommandée en cas d'apparition de signes cliniques suspects, consécutifs à une exposition avec de l'eau de mer ou des aérosols. Ces messages devront inviter les populations à risque (personnes ayant des antécédents de problèmes respiratoires) à prendre conseil auprès d'un professionnel de santé, et à limiter l'exposition potentielle aux *Ostreopsis* en ne fréquentant pas les zones impactées.

Par ailleurs, le GT « *Ostreopsis* » recommande pour le littoral de la Nouvelle-Aquitaine de reconduire la procédure de signalement des cas établie, pour la saison 2022, par le centre antipoison et de toxicovigilance (CAP-TV) de Bordeaux et l'ARS de Nouvelle-Aquitaine. Les postes de secours pourraient être également associés à la procédure de recueil des signalements d'intoxication selon des modalités à définir avec le CAP-TV de Bordeaux.

Enfin, le GT « *Ostreopsis* » recommande de recueillir dès la saison estivale 2023, des données météorologiques et océanographiques (température, force du vent, hydrodynamisme.) qui permettront d'optimiser la stratégie de surveillance les saisons suivantes.

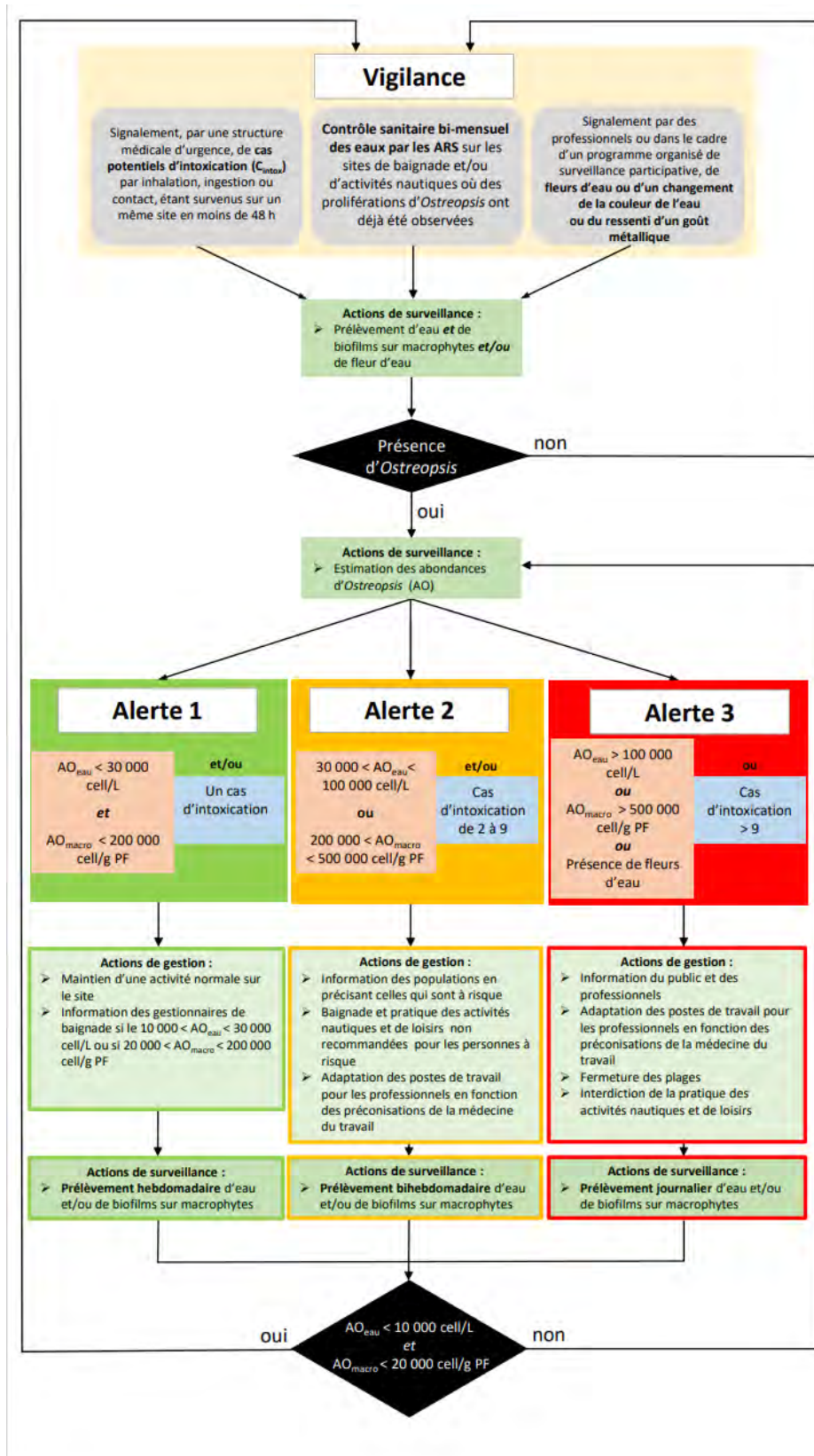


Figure 41: Arbre décisionnel pour la surveillance et le contrôle sanitaire des sites de baignade et des sites d'activités de loisirs nautiques touchés par des proliférations d'*Ostreopsis*

11.3 Besoins de recherche

Les connaissances sur le genre *Ostreopsis* restent à ce jour encore très parcellaires sans doute en raison de l'expansion récente de son aire de distribution dans les zones tempérées. Les besoins de recherche sont donc très importants aussi bien sur la diversité, la biologie, la physiologie et l'écologie de ce genre, que sur la diversité, la structure et l'activité biologique de ses toxines. Les impacts sanitaires sur l'Homme nécessitent également de nombreuses recherches, que cela soit en relation avec différentes voies d'exposition aux toxines que sur les effets à court, moyen et long terme de ces molécules.

RECHERCHES EN RELATION AVEC LA DIVERSITE, LA DISTRIBUTION, L'ÉCOLOGIE OU LES MESURES D'ABONDANCES D'OSTREOPSIS

Améliorer les connaissances sur la diversité et la biogéographie d'*Ostreopsis*

Certaines espèces du genre *Ostreopsis* ne sont pas encore décrites morphologiquement et génétiquement et d'autres ont une position taxinomique incertaine. Il est important d'améliorer les connaissances sur la description de ces taxa et sur leur phylogénie, à la fois en zones tempérées et tropicales. Ces études permettront de pouvoir mieux documenter les aires de distribution géographique des différentes espèces et leur évolution dans le temps.

En France métropolitaine, il semble important au GT « *Ostreopsis* » :

- de préciser le statut taxinomique d'*Ostreopsis* cf. *ovata* et d'*Ostreopsis* cf. *siamensis* ;
- de suivre l'évolution de leurs aires de distribution le long de la côte atlantique sur des sites sentinelles ;
- de confirmer ou d'infirmer l'absence d'*O.* cf. *siamensis* sur la côte méditerranéenne française.

Améliorer les connaissances sur l'écologie d'*Ostreopsis*

Il paraît nécessaire au GT « *Ostreopsis* » d'améliorer les connaissances sur :

- les facteurs et les processus permettant d'expliquer les raisons pour lesquelles des proliférations d'*Ostreopsis* sont observées sous des latitudes de plus en plus septentrionales. Il s'agira de tenter d'identifier en quoi le réchauffement climatique actuel et potentiellement d'autres pressions d'origine anthropique (ex : qualité de l'eau, changements dans la morphologie du littoral, modification du temps de séjour de l'eau dans les baies) peuvent être impliqués dans ce processus ;
- la dynamique spatiale et temporelle du développement des cellules planctoniques et des biofilms d'*Ostreopsis* sur leurs substrats en s'intéressant aussi bien aux facteurs et processus abiotiques (importance des nutriments minéraux et organiques, nature des substrats, conditions hydrodynamiques dont les marées, la température, la force du vent ou le courant) que biotiques (interactions avec les autres microorganismes comme les compétiteurs/les bactéries, et contrôle des populations par la prédation/le parasitisme) ; pour les biofilms, une attention particulière devra être portée sur les phanérogames présents sur la côte de la Nouvelle-Aquitaine ;
- les facteurs et processus qui conduisent au détachement des biofilms de leurs substrats (par exemple sur l'influence de l'hydrodynamique sur le processus de décrochement) ;

- la production, la composition et le rôle du mucus dans la prolifération des deux espèces d'*Ostreopsis* présentes en France. Il a été observé que ce mucus semble différent en Méditerranée et sur la Côte basque, ce qui pourrait potentiellement constituer un marqueur macroscopique permettant de différencier les deux espèces *O. cf. ovata* et *O. cf. siamensis* ;
- le déterminisme des migrations verticales des cellules d'*Ostreopsis* qui surviennent au cours de la journée entre les substrats benthiques et la colonne d'eau car ces migrations jouent un rôle déterminant dans l'exposition des populations humaines, en utilisant des approches expérimentales en micro/mésocosmes ;
- la compétition entre *O. cf. ovata* et *O. cf. siamensis* en fonction des conditions environnementales afin de pouvoir prédire l'espèce qui sera favorisée sur les sites impactés ;
- le développement de modèles prédictifs de la dynamique des populations d'*Ostreopsis*.

Développer de nouvelles stratégies et des outils pour estimer l'abondance d'*Ostreopsis*

De nouvelles approches devront être développées et standardisées pour améliorer la surveillance des proliférations d'*Ostreopsis*. C'est ainsi qu'il serait intéressant de travailler sur :

- la mise au point et la validation d'une méthodologie permettant d'estimer (i) la couverture (pourcentage de recouvrement) des substrats par les biofilms d'*Ostreopsis* à l'échelle des sites étudiés et (ii) l'étendue et la densité des fleurs d'eau à *Ostreopsis* ;
- la mise au point et la validation d'outils moléculaires quantitatifs (PCR quantitative et/ou FISH) pour estimer rapidement l'abondance des différentes espèces d'*Ostreopsis* dans les biofilms, la colonne d'eau et les fleurs d'eau ;
- le développement d'approches de type sciences participatives impliquant la participation de professionnels (pêcheurs, plagistes, surveillants de baignade...) mais aussi du grand public, pour la surveillance des populations benthiques et des fleurs d'eau d'*Ostreopsis*.

RECHERCHES EN RELATION AVEC LES TOXINES D'*OSTREOPSIS* ET LEURS IMPACTS

Développer de nouvelles stratégies et des outils pour la surveillance des toxines d'*Ostreopsis*

Pour améliorer la surveillance des toxines et ainsi limiter l'exposition des populations humaines à ces substances, il faut mettre en œuvre des travaux sur :

- la mise au point de méthodes rapides de surveillance (ex : ELISA) des toxines du groupe de la PLTX sur les sites côtiers favorables aux proliférations d'*Ostreopsis* ;
- l'analyse des processus chimiques et physiques conduisant à l'aérosolisation des toxines lors des proliférations.
- l'amélioration des techniques d'échantillonnage passif (ex : SPATT) permettant de concentrer *in situ* des toxines présentes en faibles concentrations dans l'eau de mer afin de disposer de données sur les toxines extracellulaires en milieu naturel ;
- la mise au point et la validation de matériels et de méthodes pour piéger puis quantifier les toxines d'*Ostreopsis* présentes dans les aérosols ;

- la recherche de biomarqueurs, de bioindicateurs ou d'espèces sentinelles qui pourraient permettre une détection précoce de la présence d'*Ostreopsis* et/ou de ses toxines.

Améliorer les connaissances sur la diversité des toxines produites par *Ostreopsis* et la régulation de leur production

Par ailleurs, pour mieux connaître le potentiel toxique d'*Ostreopsis*, il est nécessaire de :

- poursuivre l'identification et la caractérisation des toxines produites par les différentes espèces du genre *Ostreopsis*. Pour la France métropolitaine, il s'agira en particulier d'isoler et de caractériser les différentes toxines produites par *Ostreopsis* et d'étudier leur présence dans différentes matrices environnementales et biologiques (biomasse algale, eau, aérosols, organismes aquatiques) ;
- déterminer s'il existe, dans les populations d'*Ostreopsis*, des génotypes producteurs de toxines et d'autres qui ne le sont pas, faute de posséder les gènes permettant leur biosynthèse. Si ces deux types de génotypes coexistent au sein des populations, il faudra étudier les variations de leurs proportions et les facteurs et processus qui influencent ces variations ;
- déterminer quels sont les facteurs et processus biotiques et abiotiques qui régulent la production et la sécrétion des toxines par les différentes espèces d'*Ostreopsis*, à l'exemple de facteurs abiotiques tels que la température, la salinité, et la lumière et de processus biotiques tels que la compétition, la prédation et le parasitisme ;
- d'améliorer nos connaissances sur le transfert potentiel de ces toxines dans les réseaux trophiques et leur stabilité dans l'eau, l'air et peut-être aussi les sédiments, sachant qu'il n'existe aucune donnée sur leur présence éventuelle dans ce dernier compartiment.

Améliorer et développer des méthodes permettant l'analyse des toxines dans différents compartiments (microalgues, eau, aérosols, produits de la mer)

Il faudra pour tous les compartiments :

- optimiser les protocoles de purification des toxines du groupe de la PLTX ;
- développer des matériaux de référence certifiés de type étalons de haute pureté et matériaux à matrices avec des concentrations connues en toxines du groupe de la PLTX ;
- optimiser, valider et normaliser les méthodes analytiques permettant d'identifier et de quantifier les toxines d'*Ostreopsis* dans les différentes matrices (eau, air, produits de la mer) ;
- développer des méthodes de détection des composés toxiques en temps réel ;
- optimiser la séparation entre les cellules d'*Ostreopsis* et le mucus pour confirmer ou infirmer la présence de toxines extracellulaires dans ce mucus.

Améliorer les connaissances concernant les toxines dans les aérosols et les produits de la mer

Il faudra pour les aérosols :

- établir des protocoles standardisés de recueil et analyses des aérosols afin de pouvoir mieux comparer les résultats dans les futures études. Pour cela, il sera nécessaire de

réaliser, dans un premier temps, des expériences en milieu contrôlé puis de valider dans un second temps, les résultats sur le terrain. Par ailleurs, il serait intéressant de pouvoir collecter dans les aérosols, d'autres composés que les toxines connues car ils pourraient être impliqués dans la toxicité de ces aérosols ;

- déterminer quelles sont les conditions biotiques (phase de croissance, concentration cellulaire, présence de fleurs d'eau) qui favorisent l'aérosolisation des toxines ;
- approfondir les connaissances sur les paramètres hydrodynamiques qui favorisent la formation des aérosols ;
- estimer les distances sur lesquelles les aérosols peuvent être transportés et les paramètres météorologiques qui influencent ces distances de transport ;
- caractériser les paramètres physico-chimiques des aérosols (concentration, granulométrie, composition chimique) ;
- étudier quels sont les facteurs (biotiques et abiotiques) favorisant l'aérosolisation des composés toxiques ;
- étudier la chemodiversité des aérosols, en particulier les composés à caractère toxique, et identifier les composés responsables des symptômes observés ;
- élaborer des modélisations du transport des aérosols marins en fonction de divers paramètres physiques et biologiques.

Il est nécessaire pour les produits de la mer consommés de :

- développer des procédés de culture en grand volume afin d'obtenir la biomasse de cellules d'*Ostreopsis* nécessaire pour étudier expérimentalement les cinétiques de contamination et de décontamination des produits de la mer, l'organotropisme, les produits du métabolisme ;
- identifier les facteurs qui influencent la bioconcentration et la bioaccumulation des toxines dans les organismes marins et la métabolisation potentielle des toxines dans ces organismes ;
- étudier de la cinétique de contamination/décontamination des produits de la mer en liaison avec la dynamique des proliférations d'*Ostreopsis* dans le milieu naturel ;
- mener des études d'écotoxicologie pour évaluer l'impact des proliférations d'*Ostreopsis* sur la faune et la flore marine, en utilisant des modèles animaux et végétaux ainsi que des tests *in vitro* (ex : tissus cellulaires d'huîtres et de branchies de poissons, etc.) ;
- tenter de déterminer la cause des mortalités de certains produits de la mer associées aux proliférations d'*Ostreopsis* en Méditerranée et sur la côte atlantique. En particulier confirmer ou infirmer l'hypothèse selon laquelle les mortalités d'invertébrés observées lors des proliférations d'*Ostreopsis* sont liées à des hypoxies, voire des anoxies, plutôt qu'aux toxines produites ;
- acquérir des données de contamination des produits de la mer pour les toxines du groupe de la PLTX avec des méthodes robustes et des LD/LQ en adéquation avec la valeur guide afin de pouvoir réaliser une estimation de l'exposition alimentaire et une caractérisation du risque ;
- étudier les effets de la cuisson sur les toxines du groupe de la PLTX dans les produits de la mer ;
- mener des études d'écotoxicologie pour évaluer l'impact des proliférations d'*Ostreopsis* sur les organismes marins.

Améliorer les connaissances sur la toxicité des toxines produites par *Ostreopsis*

Les études relatives à la toxicité des toxines sont limitées par la disponibilité de ces composés, en particulier dans le commerce. Il s'agira donc de privilégier dans un premier temps la purification de ces composés et la réalisation d'études *in silico* ou *in vitro* nécessitant pas ou peu de matériel. Des études complémentaires avec la PLTX, disponible commercialement et utilisée comme un proxy, permettront d'extrapoler les résultats aux autres toxines appartenant au groupe de la PLTX. Pour les toxines d'*Ostreopsis* qui ne sont pas du groupe de la PLTX, il n'existe pas de composés identifiés pouvant servir de proxy.

Afin de pouvoir réaliser des tests de toxicité réglementaires (principalement réalisés chez l'animal), il est nécessaire avant tout de pouvoir disposer de toxines purifiées en quantité suffisante. Leur disponibilité très restreinte limitera les études qui pourront être réalisées.

Les tests de toxicité (si possible suivant les lignes directrices de l'OCDE) nécessaires pour mener une évaluation du risque sanitaire concernent :

- la toxicité aiguë et répétée par inhalation ;
- la toxicité aiguë par voie orale pour OVTX-a et OST-D ;
- la toxicité répétée par voie orale ;
- l'irritation oculaire et cutanée et de sensibilisation cutanée à l'aide de tests *in vitro* ;
- la génotoxicité *in vitro* puis *in vivo* si besoin ;
- la cancérogénèse avec par exemple des essais de transformation cellulaire pour l'aspect promoteur tumoral ;
- la reprotoxicité ;
- l'immunotoxicité ;
- la toxicité sur le développement et le neuro-développement.

Afin de déterminer les mécanismes d'action des toxines, il est important de :

- déterminer l'action des toxines du groupe de la PLTX sur la Na⁺/K⁺ ATPase et de comparer leur affinité avec celle de la PLTX elle-même ;
- déterminer l'action des toxines du groupe de la PLTX sur les autres pompes de type H⁺ ATPase ;
- évaluer les Facteurs d'Equivalence Toxique (TEF) des toxines du groupe de la PLTX ;
- réaliser des études complémentaires *in vitro* et/ou *in vivo* pour déterminer les cibles moléculaires et les mécanismes d'action de l'ensemble des toxines produites par *Ostreopsis*, afin de prédire les pathologies attendues selon les différentes voies d'exposition.

Afin d'étudier la cinétique des toxines, il faut :

- identifier les métabolites formés et les enzymes impliquées, en particulier au niveau du foie, et évaluer la toxicité des métabolites principaux ;
- déterminer les paramètres cinétiques nécessaires à la construction de modèles toxicocinétiques selon les différentes voies d'exposition ;
- évaluer l'impact de la digestion sur l'accessibilité des toxines à l'aide des systèmes de digestion *in vitro*, pouvant intégrer également le microbiote en particulier pour rechercher les causes d'une toxicité moindre de la PLTX par voie orale comparé à l'inhalation.

RECHERCHE EN LIEN AVEC L'EXPOSITION ET LES EFFETS D'OSTREOPSIS SUR LES POPULATIONS

Il conviendra de :

- réaliser des études sur la gravité et la variabilité interannuelle des symptômes chez les professionnels et les populations riveraines, ce qui permettra notamment de détecter un éventuel effet cumulatif ou une éventuelle sensibilisation de ces populations ;
- rechercher des biomarqueurs d'exposition et d'effets aux composés produits par *Ostreopsis* chez l'Homme.

12 Bibliographie

12.1 Publications

- Abboud-Abi Saab, M. 1989. "Les dinoflagellés des eaux côtières libanaises- Espèces rares ou nouvelles du phytoplancton marin". *Lebanese Science Bulletin* 5: 5-16.
- Abdennadher, M., A. B. Zouari, W. F. Sahnoun, E. Alverca, A. Penna et A. Hamza. 2017. "*Ostreopsis* cf. *ovata* in the Gulf of Gabès (south-eastern Mediterranean Sea): morphological, molecular and ecological characterization." *Harmful Algae* 63: 56-67. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.01.009>.
- Accoroni, S., M. Ubaldi, S. Bacchiocchi, F. Neri, M. Siracusa, M. G. Buonomo, A. Campanelli, and C. Totti. 2022. "Palytoxin-Analogues Accumulation in Natural Mussel Banks during an *Ostreopsis* cf. *ovata* Bloom" *Journal of Marine Science and Engineering* 10, no. 10: 1402. <https://doi.org/10.3390/jmse10101402>.
- Accoroni, S., L. Tartaglione, E. Dello Iacovo, S. Pichierri, M. Marini, A. Campanelli, C. Dell'Aversano et C. Totti. 2017. "Influence of environmental factors on the toxin production of *Ostreopsis* cf. *ovata* during bloom events." *Marine Pollution Bulletin*: 261-268. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.08.049>.
- Accoroni, S., T. Romagnoli, A. Penna, S. Capellacci, P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, L. Tartaglione, M. Abboud-Abi Saab, V. Giussani, V. Asnagli, M. Chiantore et C. Totti. 2016a. "*Ostreopsis fattorussoi* sp. nov. (Dinophyceae), a new benthic toxic *Ostreopsis* species from the eastern Mediterranean Sea." *Journal of Phycology* 52 (6): 1064-1084. <https://doi.org/10.1111/jpy.12464>.
- Accoroni, S., T. Romagnoli, S. Pichierri et C. Totti. 2016b. "Effects of the bloom of harmful benthic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* on the microphytobenthos community in the northern Adriatic Sea." *Harmful Algae* 55: 179-190. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.03.003>.
- Accoroni, S. et C. Totti. 2016. "The toxic benthic dinoflagellates of the genus *ostreopsis* in temperate areas: A review." *Advances in Oceanography and Limnology* 7 (1): 1-15. <https://doi.org/10.4081/aiol.2016.5591>.
- Accoroni, S., P. M. Glibert, S. Pichierri, T. Romagnoli, M. Marini et C. Totti. 2015. "A conceptual model of annual *Ostreopsis* cf. *ovata* blooms in the northern Adriatic Sea based on the synergic effects of hydrodynamics, temperature, and the N:P ratio of water column nutrients." *Harmful Algae* 45: 14-25. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.04.002>.
- Accoroni, S., F. Colombo, S. Pichierri, T. Romagnoli, M. Marini, C. Battocchl, A. Penna et C. Totti. 2012. "Ecology of *ostreopsis* cf. *Ovata* blooms in the northwestern adriatic sea." *Cryptogamie, Algologie* 33 (2): 191-198. <https://doi.org/10.7872/crya.v33.iss2.2011.191>
- Accoroni, S., T. Romagnoli, F. Colombo, C. Pennesi, C. G. di Camillo, M. Marini, C. Battocchi, P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso, L. Tartaglione, A. Penna et C. Totti. 2011. "*Ostreopsis* cf. *ovata* bloom in the northern Adriatic Sea during summer 2009: Ecology, molecular characterization and toxin profile." *Marine Pollution Bulletin* 62 (11): 2512-2519. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.08.003>.
- Alberts B., A. Johnson , J. Lewis , M. Raff , K. Roberts , P. Walter.2008. "Molecular Biology of the Cell." Garland Science. Fifth Edition.
- Ajani, P., Harwood, D. T., & Murray, S. A. . 2017. "Recent Trends in Marine Phycotoxins from Australian Coastal Waters." *Marine drugs* 15(2): 33. <https://doi.org/10.3390/md15020033>
- Alcala, A.C., L.C. Alcala, J.S. Garth, D. Yasumura et T. Yasumoto. 1988. "Human fatality due to ingestion of the crab *Demania reynaudii* that contained a palytoxin-like toxin. ." *Toxicon* 26 : 105-7.

- Alcala, A.C. 1983. "Recent cases of crab, cone shell and fish intoxication on Southern Negros Island, Philippines. " *Toxicon* 3:1-3.
- Alcala, A.C. et B.W. Halstead. 1970. "Human fatality due to ingestion of the crab *Demania* sp. in the Philippines. " *Clinical Toxicology* 3(4):609-11.
- Alfonso, A., A. Fernández-Araujo, C. Alfonso, B. Caramés, A. Tobio, M. C. Louzao, M. R. Vieytes et L. M. Botana. 2012. "Palytoxin detection and quantification using the fluorescence polarization technique." *Analytical Biochemistry* 424 (1): 64-70. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.02.014>.
- Aligizaki, K., G. Nikolaidis, P. Katikou, A. D. Baxevanis et T. J. Abatzopoulos. 2009. "Potentially toxic epiphytic *Prorocentrum* (Dinophyceae) species in Greek coastal waters." *Harmful Algae* 8 (2): 299-311. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.07.002>.
- Aligizaki, K., P. Katikou, G. Nikolaidis et A. Panou. 2008. "First episode of shellfish contamination by palytoxin-like compounds from *Ostreopsis* species (Aegean Sea, Greece)." *Toxicon* 51 (3): 418-427. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.10.016>.
- Aligizaki, K. et G. Nikolaidis. 2006. "The presence of the potentially toxic genera *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) in the North Aegean Sea, Greece." *Harmful Algae* 5 (6): 717-730. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2006.02.005>.
- Alkhatib, H., A. Bennouna, R. Abouabdellah, Z. Amzil, F. Herve, C.A. Moussavou-Mouity, S. Elayoubi, M. Bekkali et A. Fahde. 2022. "*Ostreopsis* spp.: Morphology, proliferation and toxic profile in the North-West of Agadir (North Atlantic Ocean)." *Regional Studies in Marine Science* 56: 102713. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rsma.2022.102713>.
- Àlvarez J., Pedrol A., Parrón I., Goxencia J., de Torres M., Manzanera M., Planas C., Cosculluela G., López A., Masó M., Vila M., Isalt R., 2005. « Brote Epidémico de sintomatología irritativa en Sant Andreu de Llavaneres: ¿el origen está en el mar? » In: *Proceedings of the XXIII Reunión de la Sociedad Española de Epidemiología*, Las Palmas de Gran Canaria, Spain. Gaceta Sanitaria 19(Supl. 1) : 3–139.
- Alves-De-souza, C., D. Varela, J. L. Iriarte, H. E. González et L. Guillou. 2012. "Infection dynamics of *Amoebophryidae* Parasitoids on harmful dinoflagellates in a southern Chilean Fjord dominated by diatoms." *Aquatic Microbial Ecology* 66 (2): 183-197. <https://doi.org/10.3354/ame01567>.
- Amano K., K. Sato, M. Hori, H. Ozaki, H. Karaki 1997. "Palytoxin-induced increase in endothelial Ca²⁺ concentration in the rabbit aortic valve." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 355(6): 751-758. doi: 10.1007/pl00005009.
- Amir, I., J. B. Harris et M. A. Zar. 1997. "The effect of palytoxin on neuromuscular junctions in the anococcygeus muscle of the rat." *Journal of Neurocytology* 26 (6): 367-376. <https://doi.org/10.1023/A:1018512920100>.
- Amorim, A., V. Veloso et A. Penna. 2010. "First detection of *Ostreopsis* cf. *siamensis* in Portuguese coastal waters." *Harmful Algae News* 42: 6-7.
- Amzil, Z., N. Chomérat, F. Hervé, G. Bilién, L. Carpentier et V. Séchet. 2021. "Prolifération d'*Ostreopsis* spp. dans les Pays Basques durant l'été 2021 : Profils toxique et taxonomie." *Rapport d'expertise IFREMER*, 7 pages, septembre 2021.
- Amzil, Z., M. Sibat, N. Chomerat, H. Grossel, F. Marco-Miralles, R. Lemee, E. Nezan et V. Sechet. 2012. "Ovatoxin-a and Palytoxin Accumulation in Seafood in Relation to *Ostreopsis* cf. *ovata* Blooms on the French Mediterranean Coast." *Marine Drugs* 10 (2): 477-496. <https://doi.org/10.3390/md10020477>.
- Ansaldi, F., A. Orsi, F. Altomonte, G. Bertone, V. Parodi, R. Carloni, P. Moscatelli, E. Pasero, M. Comaschi, P. Oreste, G. Orenco, P. Durando et G. Icardi. 2009. "Syndrome surveillance and molecular epidemiology for early detection and tracing of an outbreak of measles in Liguria, Italy." *Journal of Medical Virology* 81 (10): 1807-13. <https://doi.org/10.1002/jmv.21584>.
- Ansaldi, F., A. Orsi, F. Altomonte, G. Bertone, V. Parodi, R. Carloni, P. Moscatelli, E. Pasero, P. Oreste et G. Icardi. 2008. "Emergency department syndromic surveillance system for early detection of 5 syndromes: a pilot project in a reference teaching hospital in Genoa, Italy." *Journal of Preventive Medicine and Hygiene* 49 (4): 131-5.

- Ares, I. R., M. C. Louzao, M. R. Vieytes, T. Yasumoto et L. M. Botana. 2005. "Actin cytoskeleton of rabbit intestinal cells is a target for potent marine phycotoxins." *Journal of Experimental Biology* 208 (22): 4345-4354. <https://doi.org/10.1242/jeb.01897>.
- Armengaud A., J.-L. Lasalle, L. de Haro, H. Grossel, R. Lemée, L. Rambaud, B. Moissonnier, L. Tichadou, M. Glaizal, R. Kantin, A. Zouher, G. Drouet, J. Mattei, G. Heuzé, C. Ricoux, I. Esteve-Mousson, O. Coulon, A. Pillebout, F. Kermarec, P. Malfait. 2011. "Bilan de la surveillance et de la prévention des effets sanitaires d'*Ostreopsis* sur le littoral méditerranéen en France (2007-2010)." *BEH* :321-324.
- Armstrong, R. W., J. M. Beau, S. H. Cheon, W. J. Christ, H. Fuiioka, W. H. Ham, L. D. Hawkins, H. Jin, S. H. Kang, Y. Kishi, M. J. Martinelli, W. W. McWhorter, Jr., M. Mizuno, M. Nakata, A. E. Stutz, F. X. Talamas, M. Taniguchi, J. A. Tino, K. Ueda, J. I. Uenishi, J. B. White et M. Yonaga. 1989. "Total Synthesis of a Fully Protected Palytoxin Carboxylic Acid." *Journal of the American Chemical Society* 111 (19): 7525-7530. <https://doi.org/10.1021/ja00201a037>.
- Artigas P, Gadsby DC. 2004. Large diameter of palytoxin-induced Na/K pump channels and modulation of palytoxin interaction by Na/K pump ligands. *J Gen Physiol.* 123(4): 357-76. doi: 10.1085/jgp.200308964.
- Asakawa, M., G. Gomez-Delan, S. Tsuruda, M. Shimomura, Y. Shida, S. Taniyama, M. Barte-Quilantang et J. Shindo. 2010. "Toxicity assessment of the xanthid crab *demia cultripes* from Cebu Island, Philippines." *Journal of Toxicology* 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/172367>.
- Asnaghi, V., D. Pecorino, E. Ottaviani, A. Pedroncini, R. M. Bertolotto et M. Chiantore. 2017. "A novel application of an adaptable modeling approach to the management of toxic microalgal bloom events in coastal areas." *Harmful Algae* 63: 184-192. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.02.003>.
- Backer, L. C., B. Kirkpatrick, L. E. Fleming, Y. S. Cheng, R. Pierce, J. A. Bean, R. Clark, et al. 2005. "Occupational Exposure to Aerosolized Brevetoxins During Florida Red Tide Events: Effects on a Healthy Worker Population." [In eng]. *Environmental health perspectives* 113 (5): 644-649. <https://dx.doi.org/10.1289%2Fehp.7502>
- Ballantine, D.L., A.T. Bardales et T.R. Tosteson. 1985. "Durst Seasonal abundance of *Gambierdiscus toxicus* and *Ostreopsis* sp. in coastal waters of southwest Puerto Rico Proc. 5th Int. Coral Reef Congr. Tahiti 1985, Vol. IV (1985), pp. 417-422."
- Ballantine, D.L., T.R. Tosteson et A.T. Bardales. 1988. "Population dynamics and toxicity of natural populations of benthic dinoflagellates in southwestern Puerto Rico." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 119 (3): 201-212. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(88\)90193-1](https://doi.org/10.1016/0022-0981(88)90193-1)
- Barone, R. 2007. "Behavioural trait of *Ostreopsis ovata* (Dinophyceae) in Mediterranean rock pools: the spider's strategy. *Harmful algae News*, 33 : 1-3."
- Barroso García, P., P. R. de la Puerta, T. Parrón Carreño, P. Marín Martínez et J. Guillén Enríquez. 2008. "An epidemic outbreak with respiratory symptoms in the province of Almeria [Spain] due to toxic microalgae exposure." *Gaceta Sanitaria* 22 (6): 578-584. [https://doi.org/10.1016/S0213-9111\(08\)75357-3](https://doi.org/10.1016/S0213-9111(08)75357-3).
- Battocchi, C., C. Totti, M. Vila, M. Masó, S. Capellacci, S. Accoroni, A. Reñé, M. Scardi et A. Penna. 2010. "Monitoring toxic microalgae *Ostreopsis* (dinoflagellate) species in coastal waters of the Mediterranean Sea using molecular PCR-based assay combined with light microscopy." *Marine Pollution Bulletin* 60 (7): 1074-1084. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.01.017>.
- Bellés-Garulera, J., M. Vila, E. Borrull, P. Riobó, J. M. Franco et M. M. Sala. 2016. "Variability of planktonic and epiphytic vibrios in a coastal environment affected by *Ostreopsis* blooms." *Scientia Marina* 80: 97-106. <https://doi.org/10.3989/scimar.04405.01A>.
- Bellocci, M., G. L. Sala et S. Prandi. 2011. "The cytolytic and cytotoxic activities of palytoxin." *Toxicon* 57 (3): 449-459. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.12.013>.
- Bellocci, M., G. Ronzitti, A. Milandri, N. Melchiorre, C. Grillo, R. Poletti, T. Yasumoto et G. P. Rossini. 2008a. Addendum to "A cytolytic assay for the measurement of palytoxin based on a cultured

- monolayer cell line" [Anal. Biochem. 374 (2008) 48-55]." Analytical biochemistry 381 (1): 178. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.05.025>.
- Bellocci, M., G. Ronzitti, A. Milandri, N. Melchiorre, C. Grillo, R. Poletti, T. Yasumoto et G. P. Rossini. 2008b. "A cytolytic assay for the measurement of palytoxin based on a cultured monolayer cell line." Analytical Biochemistry 374 (1): 48-55. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.10.033>.
- Ben, M., M. Feki, A. Bouain, M. Brahim, Ben, 2015. "Occurrences of the toxic dinoflagellate *Ostreopsis ovata* in relation with environmental factors in Kerkennah Island (Southern coast of Tunisia)." *Journal of coastal life medicine* . 3: 596–599. doi:10.12980/JCLM.3.2015J5-71
- Ben-Gharbia, H., O. K. Yahia, Z. Amzil, N. Chomérat, E. Abadie, E. Masseret, M. Sibat, H. Z. Triki, H. Nouri et M. Laabir. 2016. "Toxicity and growth assessments of three thermophilic benthic dinoflagellates (*Ostreopsis* cf. *ovata*, *Prorocentrum lima* and *Coolia monotis*) developing in the Southern Mediterranean basin." *Toxins* 8 (10). <https://doi.org/10.3390/toxins8100297>.
- Berdalet, E., A.S Pavaux, R. Abós-Herrándiz, M. Travers, G. Appéré, M. Vila, J. Thomas, L. de Haro, M. Estrada, N.I. Medina-Pérez, L. Viure, B. Karlson et R. Lemée. 2022. "Environmental, human health and socioeconomic impacts of *Ostreopsis* spp. blooms in the NW Mediterranean. *in press*." *Harmful Algae*.
- Bignami, G. S. 1993. "A rapid and sensitive hemolysis neutralization assay for palytoxin." *Toxicon* 31 (6): 817-820. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(93\)90389-Z](https://doi.org/10.1016/0041-0101(93)90389-Z).
- Bignami, G.S.; Raybould, T.J.; Sachinvala, N.D.; Grothaus, P.G.; Simpson, S.B.; Lazo, C.B.; Byrnes, J.B.; Moore, R.E.; Vann, D.C. 1992. "Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunoassays for the measurement of palytoxin in biological samples." *Toxicon* . 30: 687–700.
- Biré, R., S. Trotureau, R. Lemée, C. Delpont, B. Chabot, Y. Aumond, S. Krys, 2013. "Occurrence of palytoxins in marine organisms from different trophic levels of the French Mediterranean coast harvested in 2009." *Harmful Algae* 28: 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2013.04.007>
- Biré, R., S. Trotureau, R. Lemée, D. Oregioni, C. Delpont, S. Krys, T. Guérin, 2015. "Hunt for palytoxins in a wide variety of marine organisms harvested in 2010 on the French Mediterranean coast." *Marine Drugs* 13, 5425–5446. <https://doi.org/10.3390/md13085425>
- Bizsel, N.; Aligizaki, K. Detection of *Ostreopsis* cf. *ovata* in coastal waters of Turkey (East Aegean Sea). In Proceedings of the International Conference on *Ostreopsis* Development, Villefranche-sur-Mer, France, 4–8 April 2011; Chiantore, M., Lemée, R., Mangialajo, L., Eds.; 2011; p. 53
- Blasutto, O., Celio, M., Honsell, G., Suraci, C., Venuti, M., Zanolin, B., Acquavita, A., Mattassi, G. 2010. "Gulf of Trieste, northern Adriatic Sea: First record of *Ostreopsis ovata* bloom." In *Proceedings of the 14th International Conference on Harmful Algae, Hersonissos-Crete, Greece, 1–5 November 2010*; Pagou, K., Hallegraeff, G., Eds.; International Society for the Study of Harmful Algae and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO: Copenhagen, Denmark, 2013; pp. 13–15, ISBN 978-87-990827-3-5.
- Boente-Juncal, A., S. Raposo-García, C. Vale, M. C. Louzao, P. Otero et L. M. Botana. 2020b. "In vivo evaluation of the chronic oral toxicity of the marine toxin palytoxin." *Toxins* 12 (8). <https://doi.org/10.3390/toxins12080489>.
- Boente-Juncal, A., C. Vale, M. Camiña, J. M. Cifuentes, M. R. Vieytes et L. M. Botana. 2020a. "Reevaluation of the acute toxicity of palytoxin in mice: Determination of lethal dose 50 (LD50) and No-observed-adverse-effect level (NOAEL)." *Toxicon* 177: 16-24. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.01.010>.
- Boisnoir, A., G. Bilien, R. Lemée et N. Chomérat. 2022. "First insights on the diversity of the genus *Ostreopsis* (Dinophyceae, Gonyaulacales) in Guadeloupe Island, with emphasis on the phylogenetic position of *O. heptagona*." *European Journal of Protistology* 83: 125875. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejop.2022.125875>.
- Boisnoir, A., P. Y. Pascal, N. Chomérat et R. Lemée. 2020. "Distribution of Potentially Toxic Epiphytic Dinoflagellates in Saint Martin Island (Caribbean Sea, Lesser Antilles)." *Cryptogamie, Algologie* 41 (7): 47-54. <https://doi.org/10.5252/cryptogamie-algologie2020v41a7>.

- Boisnoir, A., P. Y. Pascal, S. Marro et R. Lémée. 2019. "First spatial distribution of potentially toxic benthic dinoflagellates in the Lesser Antilles (Guadeloupe and Martinique), Caribbean Sea." *Botanica Marina* 62 (4): 309-322. <https://doi.org/10.1515/bot-2018-0002>.
- Boisnoir, A. 2018. "Les dinoflagellés benthiques de Guadeloupe et Martinique : distribution et rôle trophique pour la méiofaune." <http://www.theses.fr/2018ANTI0246>. <http://www.theses.fr/2018ANTI0246/document>.
- Boscolo, S., M. Pelin, M. De Bortoli, G. Fontanive, A. Barreras, F. Berti, S. Sosa, O. Chaloin, A. Bianco, T. Yasumoto, M. Prato, M. Poli et A. Tubaro. 2013. "Sandwich ELISA assay for the quantitation of palytoxin and its analogs in natural samples." *Environmental Science and Technology* 47 (4): 2034-2042. <https://doi.org/10.1021/es304222t>.
- Bravo, I., M. Vila, S. Casabianca, F. Rodriguez, P. Rial, P. Riobó et A. Penna. 2012. "Life cycle stages of the benthic palytoxin-producing dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* (Dinophyceae)." *Harmful Algae* 18: 24-34. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2012.04.001>.
- Brehmer, P., W. Ndiaye, A. Mbaye, A. Fricke, P. Hess, K. Mertens, N. Chomérat, I. Ndour, F. Diedhiou, G. Constantin de Magny, A. Sonko, S. Faye, F. Galgani. 2021. "Découverte de la présence d'une toxine ayant un effet sur la santé humaine, émise par une micro-algue marine sur la presqu'île du Cap-Vert (Sénégal) : pollution marine, dégradation des habitats marins et effets du changement climatique en Afrique de l'Ouest [Projet AWAtox, dossier *Ostreopsis*]." Dakar : CSRP-IRD, 13 p. multigr. (Note Politique AWA)
- Brissard, C., F. Hervé, M. Sibat, V. Séchet, P. Hess, Z. Amzil et C. Herrenknecht. 2015. "Characterization of ovatoxin-h, a new ovatoxin analog, and evaluation of chromatographic columns for ovatoxin analysis and purification." *Journal of Chromatography A* 1388: 87-101. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.02.015>.
- Brissard, C., et al. 2014. "Complex toxin profile of French Mediterranean *Ostreopsis* cf. *ovata* strains, seafood accumulation and ovatoxins prepurification." *Marine Drugs* 12(5): 2851-2876.
- Brescianini, C., C. Grillo, N. Melchiorre, R. Bertolotto, A. Ferrari, B. Vivaldi, G. Icardi, L. Gramaccioni, E. Funari et S. Scardala. 2006. "*Ostreopsis ovata* algal blooms affecting human health in Genova, Italy, 2005 and 2006." *Euro surveillance : bulletin européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 11 (9).
- Buchholz, U., E. Mouzin, R. Dickey, R. Moolenaar, N. Sass et L. Mascola. 2000. "Haff disease: from the Baltic Sea to the U.S. shore." *Emerging Infectious Diseases* 6 (2): 192-5. <https://doi.org/10.3201/eid0602.000215>.
- Bushati, M.; Koni, E.; Miho, A.; Bregaj, M. 2010. "Temporal distribution of potentially toxic algae (dinoflagellates and diatoms) in Butrinti lagoon. Nat. Montenegr. " *Podgorica*, 9 (3) : 307 - 319
- Calon, T., S. Sinno-Tellier, L. de Haro et J. Bloch. 2019. "Palytoxin exposure induced by soft corals in aquariums: Cases report of French poison centers network from 2000 to 2017." *Toxicologie Analytique et Clinique* 31 (1): 64-76. <https://doi.org/10.1016/j.toxac.2018.11.003>.
- Campbell, K., S. E. McNamee, A. C. Huet, P. Delahaut, N. Vilarino, L. M. Botana, M. Poli et C. T. Elliott. 2014. "Evolving to the optoelectronic mouse for phycotoxin analysis in shellfish." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406 (27): 6867-6881. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8156-2>.
- Cañete, E. and J. Diogène. 2008. "Comparative study of the use of neuroblastoma cells (Neuro-2a) and neuroblastomaxglioma hybrid cells (NG108-15) for the toxic effect quantification of marine toxins." *Toxicon* 52: 541-550.
- Cardoso, C.W., M.M. Oliveira e Silva, A.C. Bandeira, R.B. Silva, A.P. Prates, E.S. Soares, J.J.M. Silva, L.J.R. de Souza, M.M.S. Souza, M.A. Muhana, R.R.R. Pires, J.F. Araujo Neto, M.S.S. Santos, L.L. Mafra Junior, T.P. Alves, M.A. Schramm et G.S. Ribeiro. 2022. "Haff Disease in Salvador, Brazil, 2016-2021: Attack rate and detection of toxin in fish samples collected during outbreaks and disease surveillance." *The Lancet Regional Health - Americas* 5: 100092. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lana.2021.100092>.
- Carnicer, O., M. García-Altres, K. B. Andree, J. Diogène et M. Fernández-Tejedor. 2016. "First evidence of *Ostreopsis* cf. *ovata* in the eastern tropical Pacific Ocean, Ecuadorian coast." *Botanica Marina* 59 (4): 267-274. <https://doi.org/10.1515/bot-2016-0022>.

- Carnicer, O., C. Guallar, K. B. Andree, J. Diogène et M. Fernández-Tejedor. 2015. "Ostreopsis cf. ovata dynamics in the NW Mediterranean Sea in relation to biotic and abiotic factors." *Environmental Research* 143: 89-99. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.08.023>.
- Casabianca, S., A. Casabianca, P. Riobó, J. M. Franco, M. Vila et A. Penna. 2013. "Quantification of the toxic dinoflagellate *ostreopsis* spp. by qPCR Assay in marine aerosol." *Environmental Science and Technology* 47 (8): 3788-3795. <https://doi.org/10.1021/es305018s>.
- Casabianca, S., F. Perini, A. Casabianca, C. Battocchi, V. Giussani, M. Chiantore et A. Penna. 2014. "Monitoring toxic *Ostreopsis* cf. *ovata* in recreational waters using a qPCR based assay." *Marine Pollution Bulletin* 88 (1-2): 102-109. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.09.018>.
- Cavion, F., M. Pelin, C. Ponti, R. Della Loggia, A. Tubaro et S. Sosa. 2022. "Ecotoxicological Impact of the Marine Toxin Palytoxin on the Micro-Crustacean *Artemia franciscana*." *Marine Drugs* 20 (2). <https://doi.org/10.3390/md20020081>.
- Chapelle, A., C. Le Bec, R. Siano, F. Caradec, F. Andrieux, K. Klouch, M. Le Gac, J. Quéré, A. Youenou, M. Plus, P. Malestroit, X. Caisey. 2014. R.INT.ODE/DYNECO/PELAGOS 2014-03. Étude sur la prolifération de la micro algue *Alexandrium minutum* en rade de Brest Projet Daoulex Rapport d'avancement n° 2 : Analyse des traces biologiques d'*Alexandrium minutum* dans les sédiments de la Rade de Brest. Avril 2014
- Chambouvet, A., P. Morin, D. Marie et L. Guillou. 2008. "Control of toxic marine dinoflagellate blooms by serial parasitic killers." *Science* 322 (5905): 1254-7. <https://doi.org/10.1126/science.1164387>.
- Chan, T.Y.K. 2016. "The emergence and epidemiology of Haff disease in China;." *Toxins* 8:359.
- Chang, E., J. Deeds et K. Spaeth. 2020. "A case of long-term neurological and respiratory sequelae of inhalational exposure to palytoxin." *Toxicon* 186: 1-3. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.07.018>.
- Cheng, Y. S., Y. Zhou, C.M. Irvin., R. H. Pierce, J. Naar, L. C. Backer, L. E. Fleming, Barbara Kirkpatrick, and Dan G. Baden. 2005."Characterization of Marine Aerosol for Assessment of Human Exposure to Brevetoxins." [In eng]. *Environmental health perspectives* 113 (5): 638-643. <https://dx.doi.org/10.1289%2Fehp.7496>
- Chomérat, N., E. Antajan, I. Auby, G. Bilien, L. Carpentier, M. N. Casamajor, F. Ganthly, F. Hervé, M. Labadie, C. Méteigner, C. Paradis, M. Perrière-Rumèbe, F. Sanchez, V. Séchet et Z. Amzil. 2022. "First Characterization of *Ostreopsis* cf. *ovata* (Dinophyceae) and Detection of Ovatoxins during a Multispecific and Toxic *Ostreopsis* Bloom on French Atlantic Coast." *Marine Drugs* 20 (7). <https://doi.org/10.3390/md20070461>.
- Chomérat, N., G. Bilien, A. Couté et J. P. Quod. 2020. "Reinvestigation of *Ostreopsis mascarenensis* Quod (Dinophyceae, Gonyaulacales) from Réunion Island (SW Indian Ocean): molecular phylogeny and emended description." *Phycologia* 59 (2): 140-153. <https://doi.org/10.1080/00318884.2019.1710443>.
- Chomérat, N., G. Bilien, A. Derrien, K. Henry, A. Ung, J. Viallon, H. T. Darius, C. Mahana iti Gatti, M. Roué, F. Hervé, D. Réveillon, Z. Amzil et M. Chinain. 2019. "*Ostreopsis lenticularis* Y. Fukuyo (Dinophyceae, Gonyaulacales) from French Polynesia (South Pacific Ocean): A revisit of its morphology, molecular phylogeny and toxicity." *Harmful Algae* 84: 95-111. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.02.004>.
- Chomérat, N., G. Bilien, J. Viallon, F. Hervé, D. Réveillon, K. Henry, M. Zubia, C. Vieira, A. Ung, C. M. I. Gatti, M. Roué, A. Derrien, Z. Amzil, H. T. Darius et M. Chinain. 2020. "Taxonomy and toxicity of a bloom-forming *Ostreopsis* species (Dinophyceae, Gonyaulacales) in Tahiti island (South Pacific Ocean): one step further towards resolving the identity of *O. siamensis*." *Harmful Algae* 98. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101888>.
- Ciminiello, P., C. Dell'Aversano, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino, L. Grauso et L. Tartaglione. 2012. "Stereochemical studies on ovatoxin-a." *Chemistry - A European Journal* 18 (52): 16836-16843. <https://doi.org/10.1002/chem.201201357>.
- Ciminiello, P., C. Dell'Aversano, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino, L. Grauso, L. Tartaglione, C. Florio, P. Lorenzon, M. De Bortoli, A. Tubaro, M. Poli et G. Bignami. 2009. "Stereostructure and

- biological activity of 42-hydroxy-palytoxin: A new palytoxin analogue from Hawaiian *Palythoa* subspecies." *Chemical Research in Toxicology* 22 (11): 1851-1859. <https://doi.org/10.1021/tx900259v>.
- Ciminiello, P., C. Dell'Aversano, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino, L. Grauso, L. Tartaglione, F. Guerrini, L. Pezzolesi, R. Pistocchi et S. Vanucci. 2012. "Isolation and structure elucidation of ovatoxin-a, the major toxin produced by *Ostreopsis ovata*. 2012a." *Journal of the American Chemical Society* 134 (3): 1869-1875. <https://doi.org/10.1021/ja210784u>.
- Ciminiello, P., C. Dell'Aversano, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino, L. Grauso, L. Tartaglione, F. Guerrini et R. Pistocchi. 2010. "Complex palytoxin-like profile of *Ostreopsis ovata*. Identification of four new ovatoxins by high-resolution liquid chromatography/mass spectrometry." *Rapid Commun Mass Spectrom* 24 (18): 2735-44. <https://doi.org/10.1002/rcm.4696>.
- Ciminiello, P., C. Dell'Aversano, E. Fattorusso, M. Forino, L. Grauso et L. Tartaglione. 2011. "A 4-decade-long (and still ongoing) hunt for palytoxins chemical architecture." *Toxicon* 57 (3): 362-367. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.09.005>.
- Ciminiello, P., C. Dell'Aversano, E. Fattorusso, M. Forino, G.S. Magno, L. Tartaglione, C. Grillo et N. Melchiorre. 2006. "The Genoa 2005 outbreak. Determination of putative palytoxin in mediterranean *Ostreopsis ovata* by a new liquid chromatography tandem mass spectrometry method." *Analytical Chemistry* 78 (17): 6153-6159. <https://doi.org/10.1021/ac060250j>.
- Ciminiello, P., C. Dell'Aversano, E. Fattorusso, M. Forino, L. Tartaglione, C. Grillo et N. Melchiorre. 2008. "Putative Palytoxin and Its New Analogue, Ovatoxin-a, in *Ostreopsis ovata* Collected Along the Ligurian Coasts During the 2006 Toxic Outbreak." *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 19 (1): 111-120. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2007.11.001>.
- Ciminiello, P., C. Dell'Aversano, E. D. Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino, L. Tartaglione, G. Benedettini, M. Onorari, F. Serena, C. Battocchi, S. Casabianca et A. Penna. 2014. "First finding of *Ostreopsis cf. ovata* toxins in marine aerosols." *Environmental Science and Technology* 48 (6): 3532-3540. <https://doi.org/10.1021/es405617d>.
- Ciminiello, P., C. Dell'Aversano, E. Fattorusso, M. Forino, L. Tartaglione, C. Grillo et N. Melchiorre. 2008. "Putative Palytoxin and Its New Analogue, Ovatoxin-a, in *Ostreopsis ovata* Collected Along the Ligurian Coasts During the 2006 Toxic Outbreak." *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 19 (1): 111-120. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jasms.2007.11.001>.
- Ciminiello, P., C. Dell'Aversano, E. D. Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino, L. Tartaglione, T. Yasumoto, C. Battocchi, M. Giacobbe, A. Amorim et A. Penna. 2013. "Investigation of toxin profile of Mediterranean and Atlantic strains of *Ostreopsis cf. siamensis* (Dinophyceae) by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry." *Harmful Algae* 23: 19-27. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.hal.2012.12.002>.
- Ciminiello, P., C. Dell'Aversano, E.D. Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino, L. Tartaglione, G. Benedettini, ; M. Onorari, F. Serena, C. Battocchi, 2014. "First Finding of *Ostreopsis cf. ovata* Toxins in Marine Aerosols." *Environmental Science & Technology* 48 : 3532–3540.
- Clausen M.V., F. Hilbers , H. Poulsen 2017. The Structure and Function of the Na⁺/K⁺-ATPase Isoforms in Health and Disease. *Frontiers in Physiology* 8: 371. doi: 10.3389/fphys.2017.00371.
- Cohu, S., L. Mangialajo, T. Thibaut, A. Blanfuné, S. Marro et R. Lemée. 2013. "Proliferation of the toxic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* in relation to depth, biotic substrate and environmental factors in the North West Mediterranean Sea." *Harmful Algae* 24: 32-44. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2013.01.002>.
- Cohu, S. et R. Lemée. 2012. "Vertical distribution of the toxic epibenthic dinoflagellates *Ostreopsis cf. ovata*, *Prorocentrum lima* and *Coolia monotis* in the NW Mediterranean Sea." *Cahiers de Biologie Marine* 53 (3): 373-380.
- Cohu, S., T. Thibaut, L. Mangialajo, J. P. Labat, O. Passafiume, A. Blanfuné, N. Simon, J. M. Cottalorda et R. Lemée. 2011. "Occurrence of the toxic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* in relation with environmental factors in Monaco (NW Mediterranean)." *Marine Pollution Bulletin* 62 (12): 2681-2691. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.09.022>.

- Crinelli, R., E. Carloni, E. Giacomini, A. Penna, S. Dominici, C. Battocchi, P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, E. Fattorusso, M. Forino, L. Tartaglione et M. Magnani. 2012. "Palytoxin and an *Ostreopsis* toxin extract increase the levels of mRNAs encoding inflammation-related proteins in human macrophages via p38 MAPK and NF- κ B." *PLoS ONE* 7 (6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038139>.
- David, H., A. Laza-Martínez, I. Miguel et E. Orive. 2013. "*Ostreopsis* cf. *siamensis* and *Ostreopsis* cf. *ovata* from the Atlantic Iberian Peninsula: Morphological and phylogenetic characterization." *Harmful Algae* 30: 44-55. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2013.08.006>.
- de Haro, L. . 2021. "Animaux aquatiques dangereux et toxicologie marine. [Article 16-078-C-10]." *EMC – Pathologie professionnelle et de l'environnement* 40(4) : 1-18.
- Deeds, J. R. et M. D. Schwartz. 2010. "Human risk associated with palytoxin exposure." *Toxicol* 56 (2): 150-162. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2009.05.035>.
- Deguchi, T., N. Urakawa et S. Takamatsu. 1976. "Some Pharmacological Properties of Palythoatoxin Isolated from the Zoanthid, *Palythoa tuberculosa*." Dans *Animal, Plant, and Microbial Toxins: Volume 2 Chemistry, Pharmacology, and Immunology*, édité par Akira Ohsaka, Kyozo Hayashi, Yoshio Sawai, Ryosuke Murata, Masaru Funatsu et Nobuo Tamiya, 379-394. Boston, MA: Springer New York.
- Del Favero, G., D. Beltramo, M. Sciancalepore, P. Lorenzon, T. Coslovich, M. Poli, E. Testai, S. Sosa et A. Tubaro. 2013. "Toxicity of palytoxin after repeated oral exposure in mice and invitro effects on cardiomyocytes." *Toxicol* 75: 3-15. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2013.06.003>.
- Del Favero, G., S. Sosa, M. Pelin, E. D'Orlando, C. Florio, P. Lorenzon, M. Poli et A. Tubaro. 2012. "Sanitary problems related to the presence of *Ostreopsis* spp. in the Mediterranean Sea: A multidisciplinary scientific approach." *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita* 48 (4): 407-414. https://doi.org/10.4415/ANN_12_04_08.
- Del Favero G., C. Florio , B. Codan , S. osa , M. Poli , O. Sbaizero , J. Molgó , A. Tubaro , P. Lorenzon 2012. "The stretch-activated channel blocker Gd³⁺ reduces palytoxin toxicity in primary cultures of skeletal muscle cells." *Chemical Research in Toxicology*. 25(9): 1912-20. doi: 10.1021/tx300203x.
- Delgado, G., C. H. Lechuga-Devéze, G. Popowski, L. Troccoli et C. A. Salinas. 2006. "Epiphytic dinoflagellates associated with ciguatera in the northwestern coast of Cuba." *Revista de Biología Tropical* 54 (2): 299-310. <https://doi.org/10.15517/rbt.v54i2.13870>.
- De Virgilio, M., S. Cifarelli, G. Garofoli, G. Lamberti, V. Massari, B. Degryse 2021. "Citizen science in the monitoring of *Ostreopsis ovata* blooms in southern Italy: A five-year study." *Marine Pollution Bulletin* 173: 112981, <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112981>
- De Witte B., B. Coleman, K. Bekaert, S. Boitsov, M. J. Botelho, J. Castro-Jiménez, C. Duffy, F. Habedank, E. McGovern, K. Parmentier, V. Tornero, L. Viñas, A. D. Turner. 2022 "Threshold values on environmental chemical contaminants in seafood in the European Economic Area" *Food control* 138 : 108978, ISSN 0956-7135, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108978>.
- Di Turi, L., S. Lo Caputo, M.C. Marzano, A.M. Pastorelli, M. Pompei, L. Rositani et N. Ungaro. 2003. "Sulla presenza di *Ostreop-sidaceae* (Dinophyceae) lungo il litorale barese.[Article in Italian]." *Biologia marina mediterranea* 10(2): 675–678.
- dos Santos, M.C., B.C. de Albuquerque, R.C. Pinto, G.P. Aguiar, A G. Lescano, J.H. Santos et M.D. Alecrim. 2009. "Outbreak of Haff disease in the Brazilian Amazon." *Revista Panamericana de Salud Pública* 26 (5): 469-70. <https://doi.org/10.1590/s1020-49892009001100012>.
- Drouet, K., C. Jauzein, S. Gasparini, A-S Pavau, E. Berdalet, S. Marro, V. Davenet-Sbirrazuoli, R. Siano, R. Lemée, 2022 "The benthic toxic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* in the NW Mediterranean Sea: Relationship between sea surface temperature and bloom phenology." *Harmful Algae* 112, 102184 <https://doi.org/10.1016/j.hal.2022.102184>
- Drouet, K., C. Jauzein, D. Herviot-Heath, S. Hariri, A. Laza-Martinez, C. Lecadet, M. Plus, S. Seoane, M. Sourisseau, R. Lemée et R. Siano. 2021. "Current distribution and potential expansion of the harmful benthic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *siamensis* towards the warming waters of the Bay

- of Biscay, North-East Atlantic." *Environmental Microbiology* 23 (9): 4956-4979. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15406>.
- Drouet, K. 2020. "Impact de la température sur la biogéographie et la phénologie des dinoflagellés benthiques toxiques du genre *Ostreopsis* en Méditerranée et en Atlantique." <http://www.theses.fr/2020SORUS379>. <http://www.theses.fr/2020SORUS379/document>.
- Dubois, J. M. et J. B. Cohen. 1977. "Effect of palytoxin on membrane and potential and current of frog myelinated fibers." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 201 (1): 148-155.
- Durán-Riveroll, L. M., A. D. Cembella et Y. B. Okolodkov. 2019. "A review on the biodiversity and biogeography of toxigenic benthic marine dinoflagellates of the coasts of Latin America." *Frontiers in Marine Science* 6 (APR). <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00148>.
- Durando, P., Ansaldo, F., Oreste, P., Moscatelli, P., Marensi, L., Grillo, C., Gasparini, R., Icardi, G., 2007. "Ostreopsis ovata and human health: epidemiological and clinical features of respiratory syndrome outbreaks from a two year syndromic surveillance, 2005-2006, in north-west Italy" *Eurosurveillance*, 12, p. 23; <https://doi.org/10.2807/esw.12.23.03212-en>.
- Escalona De Motta, G., J. A. Mercado, T. R. Tosteson, I. González et J. A. Lasalde. 1992. "Modulation of acetylcholine receptor channel by a polar component isolated from toxic *Ostreopsis lenticularis* extracts." *Bulletin de la Société de pathologie exotique (1990)* 85 (5 Pt 2): 489-493.
- Espina, B., E. Cagide, M. C. Louzao, M. M. Fernandez, M. R. Vieytes, P. Katikou, A. Villar, D. Jaen, L. Maman et L. M. Botana. 2009. "Specific and dynamic detection of palytoxins by in vitro microplate assay with human neuroblastoma cells." *Bioscience Reports* 29 (1): 13-23. <https://doi.org/10.1042/BSR20080080>.
- Faimali, M., V. Giussani, V. Piazza, F. Garaventa, C. Corrà, V. Asnaghi, D. Privitera, L. Gallus, R. Cattaneo-Vietti, L. Mangialajo et M. Chiantore. 2012. "Toxic effects of harmful benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata* on invertebrate and vertebrate marine organisms." *Marine Environmental Research* 76: 97-107. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.09.010>.
- Farooq, A. V., A. G. Gibbons, M. D. Council, G. J. Harocopos, S. Holland, J. Judelson, B. L. Shoss, E. J. Schmidt, U. K. Md Noh, A. D'Angelo, R. V. Chundury, R. Judelson, V. L. Perez et A. J. W. Huang. 2017. "Corneal Toxicity Associated With Aquarium Coral Palytoxin." *American Journal of Ophthalmology* 174: 119-125. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2016.10.007>.
- Fauchot, J., M. Lévassieur et S. Roy. 2005. "Daytime and nighttime vertical migrations of *Alexandrium tamarense* in the St. Lawrence estuary (Canada). *Marine Ecology Progress Series*, 296:241-250."
- Faust, M.A. et R.A Gulledge. 2002. "Identifying harmful marine dinoflagellates." *Contribution from U. S. National Herbarium. Washington, DC: Department of Botany, National Museum of Natural History. 144p.*
- Faust, M.A., S.L. Morton et J.c.P. Quod. 1996. "Further sem study of marine dinoflagellates: The genus *Ostreopsis* (Dinophyceae)." *Journal of Phycology* 32 (6): 1053-1065. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1996.01053.x>.
- Faust, M.A. 1999. "Three new *Ostreopsis* species (Dinophyceae): *O. marinus* sp. nov., *O. belizeanus* sp. nov., and *O. caribbeanus* sp. nov." *Phycologia* 38 (2): 92-99. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-38-2-92.1>.
- Faust, M.A. 1995. "Observation of sand-dwelling toxic dinoflagellates (Dinophyceae) from widely differing sites, including two new species." *Journal of Phycology* 31 (6): 996-1003. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1995.00996.x>.
- Fernández, D. A., M. C. Louzao, N. Vilariño, B. Espiña, M. Fraga, M. R. Vieytes, A. Román, M. Poli et L. M. Botana. 2013. "The kinetic, mechanistic and cytomorphological effects of palytoxin in human intestinal cells (Caco-2) explain its lower-than-parenteral oral toxicity." *FEBS Journal* 280 (16): 3906-3919. <https://doi.org/10.1111/febs.12390>.
- Frelin, C., Van Renterghem, C., 1995. "Palytoxin. Recent electrophysiological and pharmacological evidence for several mechanisms of action") *General Pharmacology.*, 26, pp. 33-37;
- Fleming, L. E. , J. A. Bean, B. Kirkpatrick, Y. S. Cheng, R. Pierce, J. Naar, K. Nierenberg, L. C. Backer, A. Wanner, A. Reich, Y. Zhou, S. Watkins, M. Henry, J. Zaias, W. M. Abraham, J. Benson, A.

- Cassedy, J. Hollenbeck, G. Kirkpatrick, T. Clarke, and D. G. Baden. 2009. "Exposure and Effect Assessment of Aerosolized Red Tide Toxins (Brevetoxins) and Asthma" *Environmental Health Perspectives* 117:7 CID: <https://doi.org/10.1289/ehp.0900673>
- Fleming, L. E., J. A. Bean, B. Kirkpatrick, Y. S. Cheng, R. Pierce, J. Naar, K. Nierenberg, *et al.* 2009. "Exposure and Effect Assessment of Aerosolized Red Tide Toxins (Brevetoxins) and Asthma." [In eng]. *Environmental health perspectives* 117(7): 1095-1100. <https://dx.doi.org/10.1289%2Fehp.0900673>
- Franchini, A., L. Casarini et E. Ottaviani. 2008. "Toxicological effects of marine palytoxin evaluated by FETAX assay." *Chemosphere* 73 (3): 267-271.
- Fraga, M., N. Vilariño, M. C. Louzao, L. Molina, Y. López, M. Poli et L. M. Botana. 2017. "First Identification of Palytoxin-Like Molecules in the Atlantic Coral Species *Palythoa canariensis*." *Analytical Chemistry* 89 (14): 7438-7446. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01003>.
- Frenken, T., E. Alacid, S. A. Berger, E. C. Bourne, M. Gerphagnon, H. P. Grossart, A. S. Gsell, B. W. Ibelings, M. Kagami, F. C. Küpper, P. M. Letcher, A. Loyau, T. Miki, J. C. Nejtgaard, S. Rasconi, A. Reñé, T. Rohrlack, K. Rojas-Jimenez, D. S. Schmeller, B. Scholz, K. Seto, T. Sime-Ngando, A. Sukenik, D. B. Van de Waal, S. Van den Wyngaert, E. Van Donk, J. Wolinska, C. Wurzbacher et R. Agha. 2017. "Integrating chytrid fungal parasites into plankton ecology: research gaps and needs." *Environmental Microbiology* 19 (10): 3802-3822. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13827>.
- Fujiki, H., M. Suganuma, M. Nakayasu, H. Hakii, T. Horiuchi, S. Takayama et T. Sugimura. 1986. "Palytoxin is a non-12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate type tumor promoter in two-stage mouse skin carcinogenesis." *Carcinogenesis* 7 (5): 707-710. <https://doi.org/10.1093/carcin/7.5.707>.
- Fukui, M., M. Murata, A. Inoue, M. Gawel et T. Yasumoto. 1987. "Occurrence of palytoxin in the trigger fish *Melichtys vidua*." *Toxicon* 25 (10): 1121-4.
- Fukuyo, Y. 1981. "Taxonomical Study on Benthic Dinoflagellates Collected in Coral Reefs." *Nippon Suisan Gakkaishi (Japanese Edition)* 47 (8): 967-978. <https://doi.org/10.2331/suisan.47.967>.
- Funari, E., M. Manganelli et E. Testai. 2015. "*Ostreopsis* cf. *ovata* blooms in coastal water: Italian guidelines to assess and manage the risk associated to bathing waters and recreational activities." *Harmful Algae* 50: 45-56. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.10.008>.
- Furlan, M., M. Antonioli, A. Zingone, A. Sardo, C. Blason, A. Pallavicini, S. F. Umani (2013). "Molecular identification of *Ostreopsis* cf. *ovata* in filter feeders and putative predators." *Harmful Algae* 21-22: 20-29.
- Fusetani, N., S. Sato et K.a Hashimoto. 1985. "Occurrence of a water soluble toxin in a parrotfish (*Ypsiscarus ovifrons*) which is probably responsible for parrotfish liver poisoning." *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 23 1: 105-12.
- Gallitelli, M., Ungaro, M., Addante, L.M., Gentiloni Silver, M., Sabbà, C., Respiratory illness as a reaction to tropical algal blooms occurring in temperate climate 2005. *JAMA*, 293, pp. 2599-2600.
- Garcés, E., E. Alacid, I. Bravo, S. Fraga et R. I. Figueroa. 2013. "Parvilucifera sinerae (Alveolata, Myzozoa) is a Generalist Parasitoid of Dinoflagellates." *Protist* 164 (2): 245-260. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2012.11.004>.
- García-Altare, M., L. Tartaglione, C. Dell'Aversano, O. Carnicer, P. De La Iglesia, M. Forino, J. Diogène et P. Ciminiello. 2015. "The novel ovatoxin-g and isobaric palytoxin (so far referred to as putative palytoxin) from *Ostreopsis* cf. *ovata* (NW Mediterranean Sea): Structural insights by LC-high resolution MSn." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407 (4): 1191-1204. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8338-y>.
- García-Portela, M., P. Riobó, J. M. Franco, R. M. Bañuelos et F. Rodríguez. 2016. "Genetic and toxinological characterization of North Atlantic strains of the dinoflagellate *Ostreopsis* and allelopathic interactions with toxic and non-toxic species from the genera *Prorocentrum*, *Coolia* and *Gambierdiscus*." *Harmful Algae* 60: 57-69. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.10.007>.

- Gemin, M. P. 2020a. "Effets *in situ* et *in vitro* des paramètres environnementaux sur l'abondance, le métabolome et le contenu toxinique de l'*Ostreopsis cf. ovata* et purification des ovatoxines." <http://www.theses.fr/2020NANT4059>. <http://www.theses.fr/2020NANT4059/document>.
- Gémin, M. P., S. Bertrand, V. Séchet, Z. Amzil et D. Réveillon. 2021. "Combined effects of temperature and light intensity on growth, metabolome and ovatoxin content of a Mediterranean *Ostreopsis cf. ovata* strain." *Harmful Algae* 106. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2021.102060>.
- Gémin, M. P., R. Lanceleur, L. Meslier, F. Hervé, D. Réveillon, Z. Amzil, E. Ternon, O. P. Thomas et V. Fessard. 2022. "Toxicity of palytoxin, purified ovatoxin-a, ovatoxin-d and extracts of *Ostreopsis cf. ovata* on the Caco-2 intestinal barrier model." *Environ Toxicol Pharmacol* 94: 103909. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2022.103909>.
- Gémin, M.-., D. Réveillon, F. Hervé, A.-S. Pavaux, M. Tharaud, V. Séchet, S. Bertrand, R. Lemée et Z. Amzil. 2020b. "Toxin content of *Ostreopsis cf. ovata* depends on bloom phases, depth and macroalgal substrate in the NW Mediterranean Sea." *Harmful Algae* 92: 101727. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101727>.
- Giussani, V., F. Sbrana, V. Asnaghi, M. Vassalli, M. Faimali, S. Casabianca, A. Penna, P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, L. Tartaglione, A. Mazzeo et M. Chiantore. 2015. "Active role of the mucilage in the toxicity mechanism of the harmful benthic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata*." *Harmful Algae* 44: 46-53. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.02.006>.
- Gladan, Ž N., J. Arapov, S. Casabianca, A. Penna, G. Honsell, V. Brovedani, M. Pelin, L. Tartaglione, S. Sosa, C. Dell'aversano, A. Tubaro, A. Žuljević, B. Grbec, M. Čavar, M. Bužančić, A. Bakrač et S. Skejić. 2019. Massive occurrence of the harmful benthic dinoflagellate *ostreopsis cf. Ovata* in the eastern adriatic sea." *Toxins* 11 (5). <https://doi.org/10.3390/toxins11050300>.
- Gleibs, S., Mebs, D. 1999. "Distribution and sequestration of Palytoxin in coral reef animals " *Toxicon*, 37 :1521-1527; [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(99\)00093-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(99)00093-8).
- Glibert, P.M., Allen, J.I., Bouwman, A.F., Brown, C.W., Flynn, K.J., Lewitus, A.J., Madden, C.J., 2010. Modeling of HABs and eutrophication status, advances, challenges *Journal of Marine Systems*, 83: 262-275;
- Gonzales, R.B. et A.C. Alcala. 1977. "Fatalities from crab poisoning on Negro Island, Philippines." *Toxicon* 15: 169-70.
- Gómez, F., D. Qiu, R. M. Lopes et S. Lin. 2017. "Morphological and molecular characterization of the toxic dinoflagellate *Ostreopsis cf. Ovata* (Gonyaulacales: Dinophyceae) from Brazil (South Atlantic Ocean)." *Revista de Biologia Tropical* 65 (3): 1022-1032. <https://doi.org/10.15517/rbt.v65i3.26263>.
- Gorbi, S., Bocchetti, R., Binelli, A., Totti, C., Cucchiari, E., Accoroni, S., Raffaelli, F., Orletti, R., Biological effects of palytoxin-like compounds from benthic microalga *ostreopsis ovata*: A multibiomarkers approach with the mussels *mytilus galloprovincialis* (2010) *Comparative Biochemistry and Physiology A-molecular & Integrative Physiology*, 157, pp. S21-S21;
- Granéli, E., N. K. Vidyarthna, E. Funari, P. R. T. Cumaratanunga et R. Scenati. 2011. "Can increases in temperature stimulate blooms of the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata*?" *Harmful Algae* 10 (2): 165-172. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2010.09.002>.
- Grebner, W., E.C. Berglund, F. Berggren, J. Eklund, S. Harðadóttir, M.X. Andersson et E. Selander. 2019. "Induction of defensive traits in marine plankton—new copepodamide structures." *Limnology and Oceanography* 64 (2): 820-831. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/lno.11077>.
- Grossel, H., A. Blanfuné et T. Thibaut. 2012. *Projet OSCREEN : Screening sur le littoral français méditerranéen du stock d'Ostreopsis sp. macroalgal. Volet 1 : Approche géographique.* (hal-00935813). 49p.
- Grzebyk, D., Berland, B., Thomassin, B.A., Bosi, C., Arnoux, A., 1994. "Ecology of ciguateric dinoflagellates in the coral reef complex of mayotte island (S.W. Indian Ocean) " *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 178, pp. 51-66;
- Gu, H., Y. Wang, A. Derrien, F. Hervé, N. Wang, M. Pransilpa, P. Teen Lim et C. Pin Leaw. 2022. "Two toxigenic *Ostreopsis* species, *O. cf. ovata* and *O. siamensis* (Dinophyceae), from the South

- China Sea, tropical Western Pacific." *Harmful Algae* 113: 102206. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.hal.2022.102206>.
- Guennoun-Lehmann S., J.E. Fonseca, J.D. Horisberger, R.F. Rakowski. 2007. "Palytoxin acts on Na(+),K(+)-ATPase but not nongastric H(+),K(+)-ATPase." *The Journal of Membrane Biology* 216(2-3):107-16. doi: 10.1007/s00232-007-9040-1.
- Guerrini, F., L. Pezzolesi, A. Feller, M. Riccardi, P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, L. Tartaglione, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino, R. Pistocchi, 2010. "Comparative growth and toxin profile of cultured *Ostreopsis ovata* from the Tyrrhenian and Adriatic Seas" *Toxicon*, 55: 211 - 220
- Guidi-Guilvard, L. D., S. Gasparin et R. Lemée. 2012. "The negative impact of *ostreopsis* cf. *ovata* on phytal meiofauna from the coastal NW mediterranean." *Cryptogamie, Algologie* 33 (2): 121-128. <https://doi.org/10.7872/crya.v33.iss2.2011.121>.
- Guidi, F., L. Pezzolesi et S. Vanucci. 2018. "Microbial dynamics during harmful dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* growth: Bacterial succession and viral abundance pattern." *MicrobiologyOpen* 7 (4). <https://doi.org/10.1002/mbo3.584>.
- Guiry, M.D. et G.M. Guiry. 2022. "AlgaeBase. World-wide electronic publication", National University of Ireland, Galway. <https://www.algaebase.org>; consulté le 21 avril 2022. : . Consulté.
- Guo, B., G. Xie, X. Li, Y. Jiang, D. Jin, Y. Zhou, Y. Dai, S. Zhen et G. Sun. 2019. "Outbreak of Haff disease caused by consumption of crayfish (*Procambarus clarkii*) in nanjing, China." *Clinical Toxicology (Phila)* 57 (5): 331-337. <https://doi.org/10.1080/15563650.2018.1529318>.
- Habermann, E., G. Ahnert-Hilger, G.S. Chhatwal et L. Beress. 1981. "Delayed haemolytic action of palytoxin general characteristics." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 649 (2): 481-486.
- Habermann, E. 1989. "Palytoxin acts through Na+, K+-ATPase." *Toxicon* 27 (11): 1171-1187. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(89\)90026-3](https://doi.org/10.1016/0041-0101(89)90026-3).
- Hall, C., D. Levy et S. Sattler. 2015. "A Case of Palytoxin Poisoning in a Home Aquarium Enthusiast and His Family." *Case Reports in Emergency Medicine* 621815. <https://doi.org/10.1155/2015/621815>.
- Hallegraeff, G.M., 2010. "Ocean climate change, phytoplankton community responses, and harmful algal blooms: A formidable predictive challenge" *Journal of Phycology*, 46 : 220-235;
- Hariganeya, N., Y. Tanimoto, H. Yamaguchi, T. Nishimura, W. Tawong, H. Sakanari, T. Yoshimatsu, S. Sato, C. M. Preston et M. Adachi. 2013. "Quantitative PCR Method for Enumeration of Cells of Cryptic Species of the Toxic Marine Dinoflagellate *Ostreopsis* spp. in Coastal Waters of Japan." *PLoS ONE* 8 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057627>.
- Hasle, G.R., 1978. The inverted microscope method. *Phytoplankton Manual*, pp. 88-96. , Sournia A. (ed.), Paris, UNESCO;
- Hasle, G. R. et C. R. Tomas. 1996. "Chapter 1 - Introduction and Historical Background." Dans *Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates*, édité par Carmelo R. Tomas, 1-4. San Diego: Academic Press.
- Halstead B.W. 1970. "Human fatality due to ingestion of the crab *Demania* sp. in the Philippines." *The Journal of Clinical Toxicology*; 3:609-611.
- Heisler, J., P.M. Glibert, J.M Burkholder, D.M. Anderson, W. Cochlan, W.C. Dennison, Q. Dortch,, M. Suddleson, 2008. "Eutrophication and harmful algal blooms: A scientific consensus" *Harmful Algae*, 8 :3-13;
- Hirata, Y. et D. Uemura. 1985. "Toxic compounds of *Palythoa tuberculosa* (Coelenterata), palytoxin and its analogs." *Yakugaku Zasshi* 105 (1): 1-10. https://doi.org/10.1248/yakushi1947.105.1_1.
- Hirata, Y., D. Uemura, K. Ueda et S. Takano. 1979. "Several compounds from *Palythoa tuberculosa* (Coelenterata)." *Pure and Applied Chemistry* 51: 1875 - 1883.
- Hoffmann, K., M. Hermanns-Clausen, C. Buhl, M. W. Büchler, P. Schemmer, D. Mebs et S. Kaufenstein. 2008. "A case of palytoxin poisoning due to contact with zoanthid corals through a skin injury." *Toxicon* 51 (8): 1535-1537. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.03.009>.

- Honsell, G., A. Bonifacio, M. De Bortoli, A. Penna, C. Battocchi, P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, E. Fattorusso, S. Sosa, T. Yasumoto et A. Tubaro. 2013. "New Insights on Cytological and Metabolic Features of *Ostreopsis* cf. *ovata* Fukuyo (*Dinophyceae*): A Multidisciplinary Approach." *PLoS ONE* 8 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057291>.
- Hoppenrath, M., S.A. Murray, N. Chomerat et T. Horiguchi. 2014. *Marine benthic dinoflagellates - unveiling their worldwide biodiversity*. 276 pages. ISBN 978-3-510-61402-8
- Huang, K.M., S.M. Liu, Y.W. Huang, K.L. Huang, D.F. Hwang 2011. "Food poisoning caused by sunfish *Masturus lanceolatus* in Taiwan." *Journal of Food and Drug Analysis* 19 (2): 15.
- Huang, C., L. Peng, N. Gong, C. Xue, W. Wang et J. Jiang. 2019. "A Retrospective Analysis of Crayfish-Related Rhabdomyolysis (Haff Disease)." *Emergency Medicine Interview* 2019: 4209745. <https://doi.org/10.1155/2019/4209745>.
- Hwang, B.S., E.Y. Yoon, E.J. Jeong, J. Park, E.H. Kim et J.R. Rho. 2018. "Determination of the Absolute Configuration of Polyhydroxy Compound Ostreol B Isolated from the Dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata*." *Journal of Organic Chemistry* 83 (1): 194-202. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b02569>.
- Hwang, B.S., E.Y. Yoon, H.S. Kim, W. Yih, J.Y. Park, H.J. Jeong et J.R. Rho. 2013. "Ostreol A: A new cytotoxic compound isolated from the epiphytic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* from the coastal waters of Jeju Island, Korea." *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 23 (10): 3023-3027. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.03.020>.
- Ichida, S., E. Tawada, Y. Watanebe, S. Minami et M. Horiba. 1988. "Two cases of *rhabdomyolysis* induced by parrotfish liver poisoning." *Kidney Dial Japan* 25:541-544.
- Iddir-Ihaddaden, W., K. O. Abdellah, G. Merbout, R. Abtroun, B. Alamir et L. de Haro. 2013. "Conséquences sanitaires d'efflorescences d'algues du genre *Ostreopsis* en Algérie au cours de l'été 2009." *La Presse Médicale* 42 (9, Part 1): 1281-1283. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lpm.2012.10.020>.
- Ikeda, M., Mitani, K., Ito, K., 1988. "Palytoxin induces a nonselective cation channel in single ventricular cells of rat." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 337 : 591-593.
- Illoul, H., F. Rodríguez, M. Vila, N. Adjias, A. A. Younes, M. Bournissa, A. Koroghli, N. Marouf, S. Rabia et F. L. K. Ameer. 2012. "The genus *ostreopsis* along the algerian coastal waters (SW Mediterranean Sea) associated with a human respiratory intoxication episode." *Cryptogamie, Algologie* 33 (2): 209-216. <https://doi.org/10.7872/crya.v33.iss2.2011.209>.
- Inuzuka, T., D. Uemura et H. Arimoto. 2008. "The conformational features of palytoxin in aqueous solution." *Tetrahedron* 64 (33): 7718-7723. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2008.06.025>.
- Irola-Sansores, E. D., B. Delgado-Pech, E. García-Mendoza, E. J. Núñez-Vázquez, A. Olivos-Ortiz et A. Almazán-Becerril. 2018. "Population dynamics of benthic-epiphytic dinoflagellates on two macroalgae from coral reef systems of the northern Mexican Caribbean." *Frontiers in Marine Science* 5 (DEC). <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00487>.
- Ismael, A. et Y. Halim. 2012. "Potentially harmful *Ostreopsis* spp. In the coastal waters of Alexandria-Egypt." *Mediterranean Marine Science* 13 (2): 208-212. <https://doi.org/10.12681/mms.300>.
- ISPRA 2012 Monitoring and surveillance of *Ostreopsis ovata* along Italian coasts. Year 2012. ISPRA Reports 188/2013 ISBN: 978-88-448-0566-1
- ISPRA 2016 Monitoring potentially toxic *Ostreopsis* cf. *ovata* along the Italian coasts. Year 2015: Working Programme ISPRA/ARPA: *Ostreopsis* cf. *ovata* blooms along the Italian coasts. <https://www.isprambiente.gov.it/en/publications/reports/monitoring-potentially-toxic-ostreopsis-cf.-ovata-along-the-italian-coasts.-year-2015-working-programme-ispra-arpa-ostreopsis-cf.-ovata-blooms-along-the-italian-coasts>
- ISPRA. 2019. Monitoraggio della microalga potenzialmente tossica *Ostreopsis* cf. *ovata* lungo le coste italiane, anno 2018. <https://www.isprambiente.gov.it/it/pubblicazioni/rapporti/monitoraggio-della-microalga-potenzialmente-tossica-ostreopsis-cf.-ovata-lungo-le-coste-italiane-anno-2018>
- Ito, E., M. Ohkusu, K. Terao et T. Yasumoto. 1997. "Effects of repeated injections of palytoxin on lymphoid tissues in mice." *Toxicon* 35 (5): 679-688. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(96\)00184-5](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(96)00184-5).

- Ito, E. et T. Yasumoto. 2009. "Toxicological studies on palytoxin and ostreocin-D administered to mice by three different routes." *Toxicon* 54 (3): 244-251. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.04.009>.
- Ito, K., H. Karaki, Y. Ishida, N. Urakawa et T. Deguchi. 1976. "Effects of palytoxin on isolated intestinal and vascular smooth muscles." *The Japanese Journal of Pharmacology* 26 (6): 683-692. <https://doi.org/10.1254/jjp.26.683>.
- Ito, K., N. Urakawa et H. Koike. 1982. "Cardiovascular toxicity of palytoxin in anesthetized dogs." *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie* 258 (1): 146-154.
- Ito, E., Ohkusu, M., Yasumoto, T., 1986. "Intestinal injuries caused by experimental palytoxicosis in mice") *Toxicon*, 34:643-652.
- Ito, I., M. Ohkusu et T. Yasumoto. 1996. "Intestinal injuries caused by experimental palytoxicosis in mice." *Toxicon* 34 (6): 643-652. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(96\)00005-0](https://doi.org/10.1016/0041-0101(96)00005-0).
- Jauzein, C., L. Açaf, S. Accoroni, V. Asnaghi, A. Fricke, M. A. Hachani, M. abboud-Abi Saab, M. Chiantore, L. Mangialajo, C. Totti, I. Zaghmouri et R. Lemée. 2018. "Optimization of sampling, cell collection and counting for the monitoring of benthic harmful algal blooms: Application to *Ostreopsis* spp. blooms in the Mediterranean Sea." *Ecological Indicators* 91: 116-127. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.03.089>.
- Jauzein, C., D. Couet, T. Blasco et R. Lemée. 2017. "Uptake of dissolved inorganic and organic nitrogen by the benthic toxic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata*." *Harmful Algae* 65: 9-18. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.04.005>.
- Jauzein, C., A. Fricke, L. Mangialajo et R. Lemée. 2016. "Sampling of *Ostreopsis* cf. *ovata* using artificial substrates: Optimization of methods for the monitoring of benthic harmful algal blooms." *Marine Pollution Bulletin* 107 (1): 300-304. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.03.047>.
- Jin, Q., Dong, S., 2003. "Comparative studies on the allelopathic effects of two different strains of *Ulva pertusa* on *Heterosigma akashiwo* and *Alexandrium tamarense* " *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 293 :41-55;
- Karaki, H., H. Nagase, Y. Ohizumi, N. Satake et S. Shibata. 1988. "Palytoxin-induced contraction and release of endogenous noradrenaline in rat tail artery." *British Journal of Pharmacology* 95 (1): 183-188. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1988.tb16563.x>.
- Katikou, P. 2007. "Chemistry of Palytoxins and Ostreocins." Dans *Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry*, 75-93. : Blackwell Publishing.
- Katikou, P. et A. Vlamis. 2014. "Palytoxin and analogs: Ecobiology and origin, chemistry and chemical analysis. In: Seafood and freshwater toxins: Pharmacology, physiology, and detection. Edited by Botana LM, Third edn: CRC Press, Taylor & Francis group; . 46 pages."
- Kaul, P. N., M. R. Farmer et L. S. Ciereszko. 1974. "Pharmacology of palytoxin: The most potent marine toxin known." *Proceedings of the Western Pharmacology Society* Vol. 17: 294-301.
- Kerbrat, A.S., Z. Amzil, R. Pawlowicz, S. Golubic, M. Sibat, H.T. Darius, M. Chinain et D. Laurent. 2011. "First evidence of palytoxin and 42-hydroxy-palytoxin in the marine cyanobacterium *Trichodesmium*." *Marine Drugs* 9 (4): 543-560. <https://doi.org/10.3390/md9040543>.
- Kermarec, F., F. Dor, A. Armengaud, F. Charlet, R. Kantin, D. Sauzade et L. De Haro. 2008. "Health risks related to *Ostreopsis ovata* in recreational waters." *Environnement, Risques et Sante* 7 (5): 357-363. <https://doi.org/10.1684/ers.2008.0167>.
- Kim, H.S., Rho, J.-R., Lee, Y.K., Yoo, Y.D., Yih, W., 2017. New Cytotoxic Ostreols from the epiphytic Dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* isolated from Jeju costal waters in Korea, DINO11th, Bordeaux.
- Kimura, S., Hashimoto, Y., Yamazato, K., 1972. "Toxicity of the zoanthid *Palythoa tuberculosa* " *Toxicon*, 10 :611-617.
- Kirkpatrick, B., R. Pierce, Y. S. Cheng, M. S. Henry, P. Blum, S. Osborn, K. Nierenberg, et al. 2010. "Inland Transport of Aerosolized Florida Red Tide Toxins." [In eng]. *Harmful algae* 9 (2): 186-189. <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.hal.2009.09.003>

- Klijnstra, M. D., E. J. Faassen et A. Gerssen. 2021. "A generic LC-HRMS screening method for marine and freshwater phycotoxins in fish, shellfish, water, and supplements." *Toxins* 13 (11). <https://doi.org/10.3390/toxins13110823>.
- Kodama, A.M., Y. Hokama, T. Yasumoto, M. Fukui, S.J. Manea et N. Sutherland. 1989. "Sutherland N. Clinical and laboratory findings implicating palytoxin as cause of ciguatera poisoning due to *Decapтерus macrosoma*." *Toxicon* 27:1051-1053.
- Langley, R. L. et W. H. Bobbitt lii. 2007. "Haff disease after eating salmon." *Southern Medical Journal* 100 (11): 1147-1150. <https://doi.org/10.1097/SMJ.0b013e3181583673>.
- Lau, C. O., C. H. Tan, H. E. Khoo, R. Yuen, R. J. Lewis, G. P. Corpuz et G. S. Bignami. 1995. "Lophozozymus pictor toxin: A fluorescent structural isomer of palytoxin." *Toxicon* 33 (10): 1373-1377. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(95\)00075-W](https://doi.org/10.1016/0041-0101(95)00075-W).
- Lau, C.O., H.E. Khoo , R. Yuen , M. Wan, C.H. Tan 1993 "Isolation of a novel fluorescent toxin from the coral reef crab, *Lophozozymus pictor*." *Toxicon*. 31(10):1341-1345. doi: 10.1016/0041-0101(93)90409-c. PMID: 7905678.
- Laza-Martinez, A., E. Orive et I. Miguel. 2011. "Morphological and genetic characterization of benthic dinoflagellates of the genera coolia, *ostreopsis* and *prorocentrum* from the south-eastern bay of biscay." *European Journal of Phycology* 46 (1): 45-65. <https://doi.org/10.1080/09670262.2010.550387>.
- Ledreux, A., S. Krys et C. Bernard. 2009. "Suitability of the Neuro-2a cell line for the detection of palytoxin and analogues (neurotoxic phycotoxins)." *Toxicon* 53 (2): 300-308. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.12.005>.
- Lee, B. et M. G. Park. 2020. "Distribution and genetic diversity of the toxic benthic dinoflagellate genus *Ostreopsis* in Korea." *Harmful Algae* 96. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101820>.
- Lenoir, S., L. Ten-Hage, J. Turquet, J. P. Quod, C. Bernard et M. C. Hennion. 2004. "First evidence of palytoxin analogues from an *Ostreopsis mascarenensis* (Dinophyceae) benthic bloom in southwestern Indian Ocean." *Journal of Phycology* 40 (6): 1042-1051. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2004.04016.x>.
- Lenoir, S., L. Ten-Hage, J. Turquet, J. P. Quod et M. C. Hennion. 2006. "Characterisation of new analogues of palytoxin isolated from an *Ostreopsis mascarenensis* bloom in the south-western Indian Ocean." *African Journal of Marine Science* 28 (2): 389-391. <https://doi.org/10.2989/18142320609504184>.
- Lemée, R., L. Mangialajo, S. Cohu, Z. Amzil, A. Blaufune, N. Chomerat, N. Ganzin, S. Gasparini, H. Grosse, L. Guidi-Guivard, L. Hoareau, F. Duff, S. Marro, N. Simon, E. Nezan, M.L. Pedrotti, V. Sechet, O. Soliveres, T. Thibaut, 2012. "Interactions between Scientists, Managers and Policy Makers in the Framework of the French MediOs Project on *Ostreopsis* (2008–2010)." *Cryptogamie Algologie* 33, 137–142. <https://doi.org/10.7872/crya.v33.iss2.2011.137>
- Lepelletier, F., S. A. Karpov, E. Alacid, S. Le Panse, E. Bigeard, E. Garcés, C. Jeanthon et L. Guillou. 2014. "*Dinomyces arenysensis* gen. et sp. nov. (*Rhizophydiales*, *Dinomycetaceae* fam. nov.), a chytrid infecting marine dinoflagellates." *Protist* 165 (2): 230-44. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2014.02.004>.
- Levine, L., H. Fujiki, H. B. Gjika et H. Van Vunakis. 1987. "Production of antibodies to palytoxin: Neutralization of several biological properties of palytoxin." *Toxicon* 25 (12): 1273-1282. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(87\)90005-5](https://doi.org/10.1016/0041-0101(87)90005-5).
- Lindemann, E. 1928. "*Peridineae* (Dinoflagellatae) in Engler, A., Die Pflanzenfamilien nebst ihren Gattungen und wichtigeren Arten insbesondere den Nutzpflanzen." Ed. 2, 2, vi + 104 pp, 92 figs in text.
- Llewellyn, L.E., 2001. "Human fatalities in Vanuatu after eating a crab" *Medical Journal of Australia* , 175 : 343-344.
- Lobel, P.S., Anderson, D.M., Durand-Clement, M., 1988. "Assessment of ciguatera dinoflagellate populations - Sample variability and algal substrate selection" *Biological Bulletin*, 175: 94-101;
- Lockwood, W.R., 1964. "A reliable and easily sectioned epoxy embedding medium" *Anatomical Record*, 150 :129-140.

- Louzao, M.C., I.R. Ares, M.R. Vieytes, I. Valverde, J.M. Vieites, T. Yasumoto, L.M. Botana. 2007. "The cytoskeleton, a structure that is susceptible to the toxic mechanism activated by palytoxins in human excitable cells." *Federation of European Biochemical Societies Journal*, 274(8):1991-2004. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.05743.x.
- Mabrouk, L., A. Hamza, M.B. Brahim, M.N. Bradai. 2011. "Temporal and depth distribution of microepiphytes on *Posidonia oceanica* (L.) delile leaves in a meadow off Tunisia" *Marine Ecology*, 32 : 148-161;
- Mabrouk, L., A. Hamza et M. N. Bradai. 2014. "Variability in the structure of planktonic microalgae assemblages in water column associated with *Posidonia oceanica* (L.) bed in Tunisia." *Journal of Marine Biology* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/621238>.
- Mabrouk, L., A. Hamza, M. Mahfoudi et M. N. Bradai. 2012. "Spatial and temporal variations of epiphytic *Ostreopsis siamensis* on *Posidonia oceanica* (L.) Delile leaves in Mahdia (Tunisia)." *Cahiers de Biologie Marine* 53 (4): 419-427.
- Maeda, M., R. Kodama, T. Tanaka, H. Yoshizumi, K. Nomoto, T. Takemoto et M. Fujita. 1985. "Structure of insecticidal substances isolated from a red alga, *Chondria armata*. Symposium Papers, 27th Symposium on the Chemistry of Natural Products", pp616-623, Yamawaki Publishing, Hiroshima, Japan.
- Mangialajo, L., R. Bertolotto, R. Cattaneo-Vietti, M. Chiantore, C. Grillo, R. Lemee, N. Melchiorre, P. Moretto, P. Povero et N. Ruggieri. 2008. "The toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata*: Quantification of proliferation along the coastline of Genoa, Italy." *Marine Pollution Bulletin* 56 (6): 1209-1214. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.02.028>.
- Mangialajo, L., N. Ganzin, S. Accoroni, V. Asnaghi, A. Blanfuné, M. Cabrini, R. Cattaneo-Vietti, F. Chavanon, M. Chiantore, S. Cochu, E. Costa, D. Fornasaro, H. Grosseil, F. Marco-Miralles, M. Masó, A. Reñé, A. M. Rossi, M. M. Sala, T. Thibaut, C. Totti, M. Vila et R. Lemée. 2011. "Trends in *Ostreopsis* proliferation along the Northern Mediterranean coasts." *Toxicon* 57 (3): 408-420. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.11.019>.
- Mangialajo, L., Fricke, A., Perez-Gutierrez, G., Catania, D., Jauzein, C., Lemée, R. 2017. "Benthic Dinoflagellate Integrator (BEDI): A new method for the quantification of Benthic Harmful Algal Blooms." *Harmful Algae* 64 : 1-9.
- Marini, M., Fornasiero, P., Artegiani, A. 2002. "Variations of hydrochemical features in the coastal waters of Monte Conero: 1982-1990. P.S.Z.N. " *Marine Ecology*, 23 (SUPPL. 1) : 258-271.
- Mazzeo, A., M. Varra, L. Tartaglione, P. Ciminiello, Z. Zengong, P. Hess et C. Dell'aversano. 2021. "Toward isolation of palytoxins: Liquid chromatography coupled to low-or high-resolution mass spectrometry for the study on the impact of drying techniques, solvents and materials." *Toxins* 13 (9). <https://doi.org/10.3390/toxins13090650>.
- Mebs, D. 1998. "Occurrence and sequestration of toxins in food chains." *Toxicon* 36 (11): 1519-22.
- Medina-Pérez, N. I., M. Dall'osto, S. Decesari, M. Paglione, E. Moyano et E. Berdalet. 2021. "Aerosol Toxins Emitted by Harmful Algal Blooms Susceptible to Complex Air-Sea Interactions." *Environmental Science and Technology* 55 (1): 468-477. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c05795>.
- Mercado, J. A., M. Viera, G. Escalona de Motta, T. R. Tosteson, I. González and W. Silva. 1994a. "An extraction procedure modification changes the toxicity, chromatographic profile and pharmacologic action of *Ostreopsis lenticularis* extracts" *Toxicon* 32 (3): 256. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90077-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)90077-9).
- Mercado, J.A., A.L. Rivera-Rentas, I. Gonzalez, T.R. Tosteson, J. Molgó et G. Motta. 1994b. "Neuro- and myo-toxicity of extracts from the benthic dinoflagellate *Ostreopsis lenticularis* is sensitive to μ -conotoxin. Society for Neuroscience. Abstract 20."
- Mereish, K. A., G. M. McCullers, T. J. Taylor, D. L. Bunner et S. Morris. 1991. "Analysis of palytoxin by liquid chromatography and capillary electrophoresis." *Journal of Liquid Chromatography* 14 (5): 1025-1031. <https://doi.org/10.1080/01483919108049302>.
- Meunier, A. 1919. "Microplankton de la Mer Flamande: Pt. 4: Les Tintinnides et coetera."

- Meunier FA, Mercado JA, Molgó J, Tosteson TR, Escalona de Motta G. 1997. "Selective depolarization of the muscle membrane in frog nerve-muscle preparations by a chromatographically purified extract of the dinoflagellate *Ostreopsis lenticularis*." *British Journal of Pharmacology* 121(6):1224-30. doi: 10.1038/sj.bjp.0701256.
- Meunier FA, Mattei C, Molgó J. 2009. "Marine toxins potentially affecting neurotransmitter release." *Progress in Molecular and Subcellular*. 46:159-186. doi: 10.1007/978-3-540-87895-7_6.
- Milandri, A., A. Ceredi, E. Riccardi, L. Gasperetti, F. Susini, M. Casotti, L. Faiman, S. Pigozzi 2013. "Impact of *Ostreopsis ovata* on marine benthic communities: accumulation of palytoxins in mussels, sea urchins and octopuses from Italy" Proceedings of the 14th International Conference on Harmful Algae, p23-25.
- Ming-Ling W., Y. Chen-Chang, D. Jou-Fang, W. Kuo-Yen. 2014 "Hyperkalemia, Hyperphosphatemia, Acute Kidney Injury, and Fatal Dysrhythmias After Consumption of Palytoxin-Contaminated Goldspot Herring", *Annals of Emergency Medicine*, 64 (6) : 633-636, ISSN 0196-0644, <https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2014.06.001>.
- Miura D, M. Kobayashi, S. Kakiuchi, Y. Kasahara, S. Kondo 2006. "Enhancement of transformed foci and induction of prostaglandins in Balb/c 3T3 cells by palytoxin: in vitro model reproduces carcinogenic responses in animal models regarding the inhibitory effect of indomethacin and reversal of indomethacin's effect by exogenous prostaglandins." *Toxicological Sciences* ;89(1):154-63. doi: 10.1093/toxsci/kfi342.
- Mohammad-Noor, N., Daugbjerg, N., Moestrup, Ø., Anton, A., 2007. "Marine epibenthic dinoflagellates from Malaysia – a study of live cultures and preserved samples based on light and scanning electron microscopy" *Nordic Journal of Botany* 24, 629–690
- Monserrat, M., D. Catania, V. Asnaghi, M. Chiantore, R. Lemée et L. Mangialajo. 2022. "The role of habitat in the facilitation of *Ostreopsis* spp. blooms." *Harmful Algae* 113. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2022.102199>.
- Monti, M. et E. Cecchin. 2012. "Comparative growth of three strains of *ostreopsis ovata* at different light intensities with focus on inter-specific allelopathic interactions." *Cryptogamie, Algologie* 33 (2): 113-119. <https://doi.org/10.7872/crya.v33.iss2.2011.113>.
- Monti, M., M. Minocci, A. Beran et L. Iveša. 2007. "First record of *Ostreopsis* cfr. *ovata* on macroalgae in the Northern Adriatic Sea." *Marine Pollution Bulletin* 54 (5): 598-601. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2007.01.013>.
- Moore, R.E. et G. Bartolini. 1981. "Structure of Palytoxin." *Journal of the American Chemical Society* 103(9): 2491-2494."
- Moore, R.E., P. Helfrich et G.M.L. Patterson. 1982. "The deadly seaweed of Hana." *Oceanus* 25:, 54–63."
- Moore, R.E., Bartolini, G., Structure of palytoxin (1981) *Am. Chem. Soc.*, 103, pp. 2491-2494;
- Moore, R.E. et P.J. Scheuer. 1971. "Palytoxin: A new marine toxin from a coelenterate." *Science* 172 (172): 495-498. <https://doi.org/10.1126/science.172.3982.495>.
- Morton, S.p L., D.R. Norris et J.W. Bomber. 1992. "Effect of temperature, salinity and light intensity on the growth and seasonality of toxic dinoflagellates associated with ciguatera." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 157 (1): 79-90. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(92\)90076-M](https://doi.org/10.1016/0022-0981(92)90076-M).
- Moshirfar, M., Y. M. Khalifa, L. Espandar et M. D. Mifflin. 2010. "Aquarium coral keratoconjunctivitis." *Archives of ophthalmology* 128 (10): 1360-2. <https://doi.org/10.1001/archophthalmol.2010.206>.
- Mullin, J. M., K. V. Snock et M. T. McGinn. 1991. "Effects of apical vs. basolateral palytoxin on LLC-PK1 renal epithelia." *The American journal of physiology* 260 (6 Pt 1): C1201-1211. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1991.260.6.c1201>.
- Munday, R., 2008. "Occurrence and toxicology of palytoxin" *Seafood and Freshwater Toxins. Pharmacology, Physiology and Detection*, Botana L.M. (Ed), CRC Press, Boca Raton pp. 693-713;

- Munday, R. 2006. "Toxicological requirements for risk assessment of shellfish contaminants: A review." *African Journal of Marine Science* 28 (2): 447-449. <https://doi.org/10.2989/18142320609504195>.
- Munday, R. 2011. "Palytoxin toxicology : Animal studies." *Toxicon* 57 (3): 470-477. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.10.003>.
- Nagase, H., H. Karaki et N. Urakawa. 1987. "Palytoxin-induced endothelium-dependent relaxation in the isolated rat aorta." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 335 (5): 575-579. <https://doi.org/10.1007/BF00169127>.
- Nakanishi, A., M. Yoshizumi, K. Morita, Y. Murakumo, H. Houchi et M. Oka. 1991. "Palytoxin: A potent stimulator of catecholamine release from cultured bovine adrenal chromaffin cells." *Neuroscience Letters* 121 (1-2): 163-165. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(91\)90675-J](https://doi.org/10.1016/0304-3940(91)90675-J).
- Nascimento, S. M., E. V. Corrêa, M. Menezes, D. Varela, J. Paredes et S. Morris. 2012. "Growth and toxin profile of *Ostreopsis* cf. *ovata* (Dinophyta) from Rio de Janeiro, Brazil." *Harmful Algae* 13: 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.09.008>.
- Neaud-Masson N., M. Lemoine, A. Daniel 2023. "Procédure nationale pour la mise en œuvre du réseau d'observation et de surveillance du phytoplancton et de l'hydrologie dans les eaux littorales (REPHY)." *Document de prescriptions. Version 2 de janvier 2023*. ODE/VIGIES/23-01. <https://doi.org/10.13155/50389>
- Nicolas, J., P. J. M. Hendriksen, R. G. D. M. van Kleef, A. de Groot, T. F. H. Bovee, I. M. C. M. Rietjens et R. H. S. Westerink. 2014. "Detection of marine neurotoxins in food safety testing using a multielectrode array." *Molecular Nutrition and Food Research* 58 (12): 2369-2378. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400479>.
- Ninčević Gladan, Ž., J. Arapov, S. Casabianca, A. Penna, G. Honsell, V. Brovedani, M. Pelin, L. Tartaglione, S. Sosa, C. Dell'Aversano, A. Tubaro, A. Žuljević, B. Grbec, M. Čavar, M. Bužančić, A. Bakrač et S. Skejić. 2019. "Massive Occurrence of the Harmful Benthic Dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* in the Eastern Adriatic Sea." *Toxins (Basel)* 11 (5). <https://doi.org/10.3390/toxins11050300>.
- Noguchi, T., D.F. Hwang, O. Arakawa, K. Daigo, S. Sato, H. Ozaki, N. Kawai et K. Hashimoto. 1987. "Palytoxin as the causative agent in the parrotfish poisoning. Progress in Venom and Toxin Research." *First Asia-Pacific Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins*. 325-35.
- Nordt, S. P., J. Wu, S. Zahller, R. F. Clark et F. L. Cantrell. 2011. "Palytoxin poisoning after dermal contact with zoanthid coral." *Journal of Emergency Medicine* 40 (4): 397-399. <https://doi.org/10.1016/j.jemermed.2009.05.004>.
- Norris, B, J.W. et E. Balech. 1985. "Benthic dinoflagellates associated with ciguatera from the Florida Keys. 1. *Ostreopsis heptagona* sp. nov." in Toxic dinoflagellates . Proceedings of the Third International Conference on Toxic Dinoflagellates, St. Andrews, New Brunswick, Canada, June 8-12, 1985. (Anderson, D.M., White, A.W. & Baden, D.G. Eds), pp. 27-32. New York, Amsterdam, Oxford:
- Okano, H., H. Masuoka, S. Kamei, T. Seko, S. Koyabu, K. Tsuneoka, T. Tamai, K. Ueda, S. Nakazawa, M. Sugawa, H. Suzuki, M. Watanabe, R. Yatani et T. Nakano. 1998. "*Rhabdomyolysis* and myocardial damage induced by palytoxin, a toxin of blue humphead parrotfish." *Internal Medicine* 37 (3): 330-333. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.37.330>.
- Okolodkov, Y.B., F. Del Carmen Merino-Virgilio, J.A. Aké-Castillo, A.C. Aguilar-Trujillo, S. Espinosa-Matías et A. Herrera-silveira. 2014. "Seasonal changes in epiphytic dinoflagellate assemblages near the northern coast of the Yucatan Peninsula, Gulf of Mexico." *Acta Botanica Mexicana* 107, 121–151.
- Okolodkov, Y.B., G. Campos-Bautista, I. Gárate-Lizárraga, J.A. G. González-González, M. Hoppenrath et V. Arenas. 2007. "Seasonal changes of benthic and epiphytic dinoflagellates in the Veracruz reef zone, Gulf of Mexico." *Aquatic Microbial Ecology* 47 (3): 223-237. <https://doi.org/10.3354/ame047223>.

- Oku, N., N. U. Sata, S. Matsunaga, H. Uchida et N. Fusetani. 2004. "Identification of palytoxin as a principle which causes morphological changes in rat 3Y1 cells in the zoanthid *Palythoa* aff. *margaritae*." *Toxicon* 43 (1): 21-25. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.10.012>.
- Onuma, Y., Satake, M., Ukena, T., Roux, J., Chanteau, S., Rasolofonirina, N., Ratsimaloto, M., Yasumoto, T. 1999. "Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism" *Toxicon*, 37 : 55-65.
- Pagnon J., Karunasinghe N., Ferguson L.R. Genetic Toxicology Report. "Ames Bacterial Mutagenicity Tests, Palytoxin." University of Auckland; Auckland, New Zealand: 2008. Technical Report.
- Paradis, C. et M. Labadie. 2022. "Effets sanitaires liés à la présence de microalgues du genre *Ostreopsis* sur la côte basque au cours de l'été 2021." *Rapport du CHU/Centre Antipoison de Bordeaux*, 33 pages.
- Park, J., J. Hwang, J. H. Hyung et E. Y. Yoon. 2020. "Temporal and spatial distribution of the toxic epiphytic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* in the coastal waters off Jeju Island, Korea." *Sustainability (Switzerland)* 12 (14). <https://doi.org/10.3390/su12145864>.
- Parsons, M.L. et Q. Dortch. 2002. "Sedimentological evidence of an increase in *Pseudo-nitzschia* (*Bacillariophyceae*) abundance in response to coastal eutrophication." *Limnology and Oceanography* 47 (2): 551-558. <https://doi.org/10.4319/lo.2002.47.2.0551>.
- Parsons, M.L. et L.B. Preskitt. 2007. "A survey of epiphytic dinoflagellates from the coastal waters of the island of Hawaiï." *Harmful Algae* 6 (5): 658-669. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2007.01.001>.
- Patocka, J., E. Nepovimova, Q. Wu et K. Kuca. 2018. "Palytoxin congeners." *Archives of Toxicology* 92 (1): 143-156. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2105-8>.
- Pavaux, A.S., E. Berdalet et R. Lemée. 2020. "Chemical Ecology of the Benthic Dinoflagellate Genus *Ostreopsis*: Review of Progress and Future Directions." *Frontiers in Marine Science* 7. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00498>.
- Pavaux, A.S., J. Rostan, L. Guidi-Guilvard, S. Marro, E. Ternon, O.P. Thomas, R. Lemée et ffS. Gasparini. 2019. "Effects of the toxic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* on survival, feeding and reproduction of a phytal harpacticoid copepod." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 516: 103-113. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2019.05.004>.
- Pavaux, A.S., D. Velasquez-Carjaval, K. Drouet, A. Lebrun, A. Hiroux, S. Marro, E. Christians, S. Castagnetti et R. Lemée. 2021. "Daily variations of *Ostreopsis* cf. *ovata* abundances in NW Mediterranean Sea." *Harmful Algae* 110. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2021.102144>.
- Pierce, R. H., M.S. Henry, P.C. Blum, S.L. Hamel, B. Kirkpatrick, Y.S. Cheng, Y. Zhou, C.M. Irvin, J. Naar, A. Weidner, L.E. Fleming, L.C. Backer, D.G. Baden, 2005. "Brevetoxin composition in water and marine aerosol along a Florida beach: Assessing potential human exposure to marine biotoxins." *Harmful Algae* 4(6): 965-972. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2004.11.004>
- Pearce, I., J.A. Marshall et G.M. Hallegraef. 2001. "Toxic epiphytic dinoflagellates from East Coast Tasmania, Australia." *Proceedings of the 9th International Conference on Harmful Algal Blooms*. 9th International Conference on Harmful Algal Blooms, Hobart, Tasmania, Australia.
- Pelin, M., C. Ponti, S. Sosa, D. Gibellini, C. Florio et A. Tubaro. 2013. "Oxidative stress induced by palytoxin in human keratinocytes is mediated by a H⁺-dependent mitochondrial pathway." *Toxicology and Applied Pharmacology* 266 (1): 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.10.023>.
- Pelin, M., G. Stocco, C. Florio, S. Sosa et A. Tubaro. 2020. "In vitro cell sensitivity to palytoxin correlates with high gene expression of the na⁺ /k⁺-atpase β 2 subunit isoform." *International Journal of Molecular Sciences* 21 (16): 1-13. <https://doi.org/10.3390/ijms21165833>.
- Pelin, M., C. Florio, C. Ponti, M. Lucafò, D. Gibellini, A. Tubaro et S. Sosa. 2016. "Pro-inflammatory effects of palytoxin: An: *in vitro* study on human keratinocytes and inflammatory cells." *Toxicology Research* 5 (4): 1172-1181. <https://doi.org/10.1039/c6tx00084c>.
- Pelin, M., M. Forino, V. Brovedani, L. Tartaglione, C. Dell'Aversano, R. Pistocchi, M. Poli, S. Sosa, C. Florio, P. Ciminiello et A. Tubaro. 2016. "Ovatoin-a, A Palytoxin Analogue Isolated from *Ostreopsis* cf. *ovata* Fukuyo: Cytotoxic Activity and ELISA Detection." *Environmental Science and Technology* 50 (3): 1544-1551. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b04749>.

- Pelin, M., C. Zanette, M. De Bortoli, S. Sosa, R. D. Loggia, A. Tubaro et C. Florio. 2011. "Effects of the marine toxin palytoxin on human skin keratinocytes: Role of ionic imbalance." *Toxicology* 282 (1-2): 30-38. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.01.010>.
- Pelin, M., V. Brovedani, S. Sosa et A. Tubaro. 2016. "Palytoxin-containing aquarium soft corals as an emerging sanitary problem." *Marine Drugs* 14 (2). <https://doi.org/10.3390/md14020033>.
- Penna, A., C. Battocchi, S. Capellacci, S. Fraga, K. Aligizaki, R. Lemée et C. Vernesi. 2014. "Mitochondrial, but not rDNA, genes fail to discriminate dinoflagellate species in the genus *Ostreopsis*." *Harmful Algae* 40: 40-50. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.10.004>.
- Penna, A., S. Fraga, C. Battocchi, S. Casabianca, M. G. Giacobbe, P. Riobó et C. Vernesi. 2010. "A phylogeographical study of the toxic benthic dinoflagellate genus *Ostreopsis* Schmidt." *Journal of Biogeography* 37 (5): 830-841. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2009.02265.x>.
- Penna, A., S. Fraga, C. Battocchi, S. Casabianca, F. Perini, Capellacci Samuela, A. Casabianca, P. Riobo, M. Giacobbe, C. Totti, S. Accoroni, M. Vila, A. Rene, M. Scardi, K. Allgizaki, L. Nguyen-goc et C. Vernesi. 2012. "Genetic diversity of the genus *Ostreopsis* Schmidt: Phylogeographical considerations and molecular methodology applications for field detection in the Mediterranean Sea." *Cryptogamie, Algologie* 33 (2): 153-163. <https://doi.org/10.7872/crya.v33.iss2.2011.153>.
- Penna, A., M. Vila, S. Fraga, M. G. Giacobbe, A. Francesco, P. Riobó et C. Vernesi. 2005. "Characterization of *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) isolates in the western Mediterranean Sea based on morphology, toxicity and internal transcribed spacer 5.8s rDNA sequences." *Journal of Phycology* 41 (1): 212-225. <https://doi.org/10.1111/J.1529-8817.2005.04011.x>.
- Perini, F., Casabianca, A., Battocchi, C., Accoroni, S., Totti, C., Penna, A., 2011. New approach using the real-time pcr method for estimation of the toxic marine dinoflagellate *ostreopsis* cf. *Ovata* in marine environment PLoS ONE, p. 6;
- Pezzolesi, L., F. Guerrini, P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, E. D. Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino, L. Tartaglione et R. Pistocchi. 2012. "Influence of temperature and salinity on *Ostreopsis* cf. *ovata* growth and evaluation of toxin content through HR LC-MS and biological assays." *Water Research* 46 (1): 82-92. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.10.029>.
- Pfannkuchen, M., J. Godrijan, D. Marić Pfannkuchen, L. Iveša, P. Kružić, P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino, L. Tartaglione et M. Godrijan. 2012. "Toxin-producing *ostreopsis* cf. *ovata* are likely to bloom undetected along Coastal Areas." *Environmental Science and Technology* 46 (10): 5574-5582. <https://doi.org/10.1021/es300189h>.
- Pichierri, S., S. Accoroni, L. Pezzolesi, F. Guerrini, T. Romagnoli, R. Pistocchi et C. Totti. 2017. "Allelopathic effects of diatom filtrates on the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata*." *Marine Environmental Research* 131: 116-122. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.09.016>.
- Pin, L. C., L. P. Teen, A. Ahmad et G. Usup. 2001. "Genetic diversity of *Ostreopsis ovata* (Dinophyceae) from Malaysia." *Marine Biotechnology* 3 (3): 246-255. <https://doi.org/10.1007/s101260000073>.
- Pistocchi, R., L. Pezzolesi, F. Guerrini, S. Vanucci, C. Dell'Aversano et E. Fattorusso. 2011. "A review on the effects of environmental conditions on growth and toxin production of *Ostreopsis ovata*." *Toxicon* 57 (3): 421-428. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.09.013>.
- Poli, M., P. Ruiz-Olvera, A. Nalca, S. Ruiz, V. Livingston, O. Frick, D. Dyer, C. Schellhase, J. Raymond, D. Kulis, D. Anderson, S. McGrath et J. Deeds. 2018. "Toxicity and pathophysiology of palytoxin congeners after intraperitoneal and aerosol administration in rats." *Toxicon* 150: 235-250. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.06.067>.
- Prato, E., F. Biantolino, A. P. Bisci et C. Caroppo. 2011. "Preliminary assessment of *Ostreopsis* cf. *ovata* acute toxicity by using a battery bioassay." *Chemistry and Ecology* 27 (SUPPL.2): 117-125. <https://doi.org/10.1080/02757540.2011.625930>.
- Prevett, A., J. Lindström, J. Xu, B. Karlson et E. Selander. 2019. "Grazer-induced bioluminescence gives dinoflagellates a competitive edge." *Current Biology* 29 (12): R564-R565. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.05.019>.

- Queguiner, B. 2013. cours de master d'océanographie Structure et Fonctionnement des Ecosystèmes Pélagiques Marins. Centre d Océanologie de Marseille, Aix-Marseille Université ; CNRS ; LOBUMR 6535, Laboratoire d Océanographie et de Biogéochimie, OSU/Centre d Océanologie de Marseille, 93 pp.
- Quod, J.P. 1994. "*Ostreopsis mascarenensis* sp. nov (Dinophyceae), dinoflagelle toxique associé à la ciguatera dans l'Océan Indien." *Cryptogamie Algol* 15: 243–251.
- Ramos V, Vasconcelos V. 2010. Palytoxin and analogs: biological and ecological effects. *Mar Drugs*. 8(7): 2021-2037. doi: 10.3390/md8072021.
- Randall, J. E. 2005. "Review of clupeotoxism, an often fatal illness from the consumption of clupeoid fishes." *Pacific Science* 59 (1): 73-77. <https://doi.org/10.1353/psc.2005.0013>.
- Reale, O., A. Huguet et V. Fessard. 2019. "Novel insights on the toxicity of phycotoxins on the gut through the targeting of enteric glial cells." *Marine Drugs* 17 (7). <https://doi.org/10.3390/md17070429>.
- Rhodes, L. 2011. "World-wide occurrence of the toxic dinoflagellate genus *Ostreopsis* Schmidt." *Toxicon* 57 (3): 400-407. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.05.010>.
- Rhodes, L., J. Adamson, T. Suzuki, L. Briggs et I. Garthwaite. 2000. "Toxic marine epiphytic dinoflagellates, *Ostreopsis siamensis* and *Coolia monotis* (Dinophyceae), in New Zealand." *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 34 (2): 371-383. <https://doi.org/10.1080/00288330.2000.9516939>.
- Rhodes, L., N. Towers, L. Briggs, R. Munday et J. Adamson. 2002. "Uptake of palytoxin-like compounds by shellfish fed *Ostreopsis siamensis* (Dinophyceae)." *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 36 (3): 631-636. <https://doi.org/10.1080/00288330.2002.9517118>.
- Rhodes, L.L., Munday, R., Palytoxins: a risk to human health? (2004) Proceedings of the 20th Marine Biotoxin Science Workshop, Wellington New Zealand, New Zealand Food Safety Authorities, vol. 23.
- Richlen, M. L. et P. S. Lobel. 2011. "Effects of depth, habitat, and water motion on the abundance and distribution of ciguatera dinoflagellates at Johnston Atoll, Pacific Ocean." *Marine Ecology Progress Series* 421: 51-66. <https://doi.org/10.3354/meps08854>.
- Riobó, P., Paz, B., Franco, J.M., Vázquez, J.A., Murado, M.A., Cacho, E., Mouse bioassay for palytoxin. Specific symptoms and dose response against dose-death time relationships (2008) *Food Chem. Toxicol.*, 46, pp. 2639-2647.
- Riobó, P., B. Paz et J. M. Franco. 2006. "Analysis of palytoxin-like in *Ostreopsis* cultures by liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorescence detection." *Analytica Chimica Acta* 566 (2): 217-223. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.03.013>.
- Riobó, P., B. Paz, J. M. Franco, J. A. Vázquez et M. A. Murado. 2008. "Proposal for a simple and sensitive haemolytic assay for palytoxin. Toxicological dynamics, kinetics, ouabain inhibition and thermal stability." *Harmful Algae* 7 (4): 415-429. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2007.09.001>.
- Robinson, C. P. et D. R. Franz. 1991. "Effects of Palytoxin on Guinea Pig Tracheal Strips." *Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists* 8 (7): 859-864. <https://doi.org/10.1023/A:1015895227196>.
- Robinson, C. P., D. R. Franz et M. E. Bondura. 1992. "Effects of palytoxin on porcine coronary artery rings." *Journal of Applied Toxicology* 12 (3): 185-189. <https://doi.org/10.1002/jat.2550120306>.
- Rossi, R., V. Castellano, E. Scalco, L. Serpe, A. Zingone et V. Soprano. 2010. "New palytoxin-like molecules in Mediterranean *Ostreopsis* cf. *ovata* (dinoflagellates) and in *Palythoa tuberculosa* detected by liquid chromatography-electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry." *Toxicon* 56 (8): 1381-1387. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.08.003>.
- Rossini GP, Bigiani A. 2011. "Palytoxin action on the Na⁺,K⁺-ATPase and the disruption of ion equilibria in biological systems." *Toxicon*. 57(3): 429-39. doi: 10.1016/j.toxicon.2010.09.011.
- Roué M., H. T. Darius, J. Viallon, A. Ung, C. Gatti, D. T. Harwood, M. Chinain. 2018. "Application of solid phase adsorption toxin tracking (SPATT) devices for the field detection of *Gambierdiscus* toxins." *Harmful Algae*, 71:40-49, ISSN 1568-9883, <https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.11.006>.

- Saab, M. A. A., M. Fakhri, M. T. Kassab et N. Matar. 2013. "Seasonal and spatial variations of the dinoflagellate *ostreopsis siamensis* in the lebanese coastal waters (eastern mediterranean)." *Cryptogamie, Algologie* 34 (1): 57-67. <https://doi.org/10.7872/crya.v34.iss1.2013.57>.
- Sansoni, G., B. Borghini, G. Camici, M. Cassoti, P. Righini et C. Rustighi. 2003. "Fioriture algali di *Ostreopsis ovata* (*Gonyaulacales*: Dinophyceae): un problema emergent." *Biologia ambientale* 17 (1): 17-23.
- Santos, M., P. B. Oliveira, M. T. Moita, H. David, M. F. Caeiro, A. Zingone, A. Amorim et A. Silva. 2019. "Occurrence of *Ostreopsis* in two temperate coastal bays (SW iberia): Insights from the plankton." *Harmful Algae* 86: 20-36. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.03.003>.
- Saracino, O. et F. Rubino. 2006. "Phytoplankton composition and distribution along the Albanian coast, South Adriatic Sea." *Nova Hedwigia* 83: 253-266. <https://doi.org/10.1127/0029-5035/2006/0083-0253>.
- Sato, S., T. Nishimura, K. Uehara, H. Sakanari, W. Tawong, N. Hariganeya, K. Smith, L. Rhodes, T. Yasumoto, Y. Taira, S. Suda, H. Yamaguchi et M. Adachi. 2011. "Phylogeography of *Ostreopsis along* west Pacific coast, with special reference to a novel clade from Japan." *PLoS ONE* 6 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027983>.
- Satoh E, Ishii T, Nishimura M. 2003. "Palytoxin-induced increase in cytosolic-free Ca²⁺ in mouse spleen cells". *European Journal of Pharmacology* 465(1-2): 9-13. doi: 10.1016/s0014-2999(03)01459-6.
- Sauviat, M. P. 1989. "Palytoxin increases an outward K⁺ current in frog heart fibres." *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 414 (1 Supplement). <https://doi.org/10.1007/BF00582293>.
- Sauviat, M. P., C. Pater et J. Berton. 1987. "Does palytoxin open a sodium-sensitive channel in cardiac muscle?" *Toxicon* 25 (7): 695-704. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(87\)90119-X](https://doi.org/10.1016/0041-0101(87)90119-X).
- Sbrana, F., E. Landini, N. Gjerci, F. Viti, E. Ottaviani et M. Vassalli. 2017. "OvMeter: an automated 3D-integrated opto-electronic system for *Ostreopsis cf. ovata* bloom monitoring." *Journal of Applied Phycology* 29 (3): 1363-1375. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1069-7>.
- Scalco, E., C. Brunet, F. Marino, R. Rossi, V. Soprano, A. Zingone et M. Montresor. 2012. "Growth and toxicity responses of Mediterranean *Ostreopsis cf. ovata* to seasonal irradiance and temperature conditions." *Harmful Algae* 17: 25-34. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2012.02.008>.
- Scheiner-Bobis, G., T. Hübschle et M. Diener. 2002. "Action of palytoxin on apical H⁺/K⁺-ATPase in rat colon." *European Journal of Biochemistry* 269 (16): 3905-3911. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03056.x>.
- Scheiner-Bobis G., D. M. zu Heringdorf, M. Christ, E. Habermann 1994. "Palytoxin induces K⁺ efflux from yeast cells expressing the mammalian sodium pump." *Molecular Pharmacology* 45(6): 1132-1136. PMID: 7912814.
- Schilling W.P., D. Snyder, W.G. Sinkins, M. Estacion .. 2006. "Palytoxin-induced cell death cascade in bovine aortic endothelial cells." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* . 291(4): C657-C667. doi: 10.1152/ajpcell.00063.2006.
- Schmitt, C., R. Torrents, B. Domangé, M. Glaizal, N. Simon et L. de Haro. 2018. "Palytoxin poisoning with soft coral from a tank in France: 3 cases reports." *Presse Medicale* 47 (2): 178-180. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2017.11.004>.
- Schmitt, C. et L. de Haro. 2013. "Clinical marine toxicology: A European perspective for clinical toxicologists and poison centers." *Toxins* 5 (8): 1343-1352. <https://doi.org/10.3390/toxins5081343>.
- Schmidt, J. 1901. "Preliminary report of the botanical results of the Danish Expedition to Siam (1899-1900) Pt. IV Peridinales." *Botanisk Tidsskrift* 24.
- Sechet, V., M. Sibat, N. Chomérat, E. Nézan, H. Grosseil, J. B. Lehebel-Peron, T. Jauffrais, N. Ganzin, F. Marco-Miralles, R. Lemée et Z. Amzil. 2012. "*Ostreopsis cf. ovata* in the French Mediterranean coast: Molecular characterisation and toxin profile." *Cryptogamie, Algologie* 33 (2): 89-98. <https://doi.org/10.7872/crya.v33.iss2.2011.089>.

- Seemann, P., C. Gernert, S. Schmitt, D. Mebs et U. Hentschel. 2009. "Detection of hemolytic bacteria from *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Zoantharia) using a novel palytoxin-screening assay." *Antonie Van Leeuwenhoek*, DOI: 10.1007/s10482-009-9353-4.
- Selander, E., P. Thor, G. Toth, H. Pavia, 2006. "Copepods induce paralytic shellfish toxin production in marine dinoflagellates." *Proceedings of the Royal Society* 273: 1673–1680 .
- Selina, M. S., T. V. Morozova, D. I. Vyshkvartsev et T. Y. Orlova. 2014. "Seasonal dynamics and spatial distribution of epiphytic dinoflagellates in Peter the Great Bay (Sea of Japan) with special emphasis on *Ostreopsis* species." *Harmful Algae* 32: 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2013.11.005>.
- Selina, M. S. et T. Y. Orlova. 2010. "First occurrence of the genus *Ostreopsis* (Dinophyceae) in the Sea of Japan." *Botanica Marina* 53 (3): 243-249. <https://doi.org/10.1515/BOT.2010.033>.
- Shears, N.T. et P.M. Ross. 2009. "Blooms of benthic dinoflagellates of the genus *Ostreopsis*; an increasing and ecologically important phenomenon on temperate reefs in New Zealand and worldwide." *Harmful Algae* 8 (6): 916-925. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2009.05.003>.
- Sheridan, R.E., S.S. Deshpande, M. Adler, 2005. "Cytotoxic actions of palytoxin on aortic smooth muscle cells in culture" *Journal of Applied Toxicology*, 25:365-373.
- Shinzato, T., A. Furusu, T. Nishino, K. Abe, T. Kanda, T. Maeda, S. Kohno, 2008. "Cowfish (Umisuzume, *Lactoria diaphana*) poisoning with rhabdomyolysis" *Internal Medicine Journal*, 47: 853-856.
- Simonini, R., M. Orlandi et M. Abbate. 2011. "Is the toxic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* harmful to Mediterranean benthic invertebrates? Evidences from ecotoxicological tests with the polychaete *Dinophilus gyrociliatus*." *Marine Environmental Research* 72 (4): 230-233. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.08.009>.
- Silva, C.I.D, C.F. Gonçalves-de-Albuquerque, B.P.T. Moraes, D.G. Garcia, P. Burth 2021. "Na/K-ATPase: Their role in cell adhesion and migration in cancer." *Biochimie* 185:1-8. doi: 10.1016/j.biochi.2021.03.002.
- Sosa, S., G. Del Favero, M. De Bortoli, F. Vita, M. R. Soranzo, D. Beltramo, M. Ardizzone et A. Tubaro. 2009. "Palytoxin toxicity after acute oral administration in mice." *Toxicology Letters* 191 (2-3): 253-259. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.09.009>.
- Strickland, J.D.H., Parsons, T.R., 1968. "A practical handbook of seawater analysis" *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 167 : 310.
- Sud, P., M. K. Su, H. A. Greller, N. Majlesi et A. Gupta. 2013. "Case Series: Inhaled Coral Vapor-Toxicity in a Tank." *Journal of Medical Toxicology* 9 (3): 282-286. <https://doi.org/10.1007/s13181-013-0307-x>.
- Suh, E.M. et Y. Kishi. 1994. "Synthesis of palytoxin from palytoxin carboxylic acid." *Journal of the American Chemical Society*, 116(24):11205-11206.
- Suzuki, T., R. Watanabe, R. Matsushima, K. Ishihara, H. Uchida, S. Kikutsugi, T. Harada, H. Nagai, M. Adachi, T. Yasumoto et M. Murata. 2013. "LC-MS/MS analysis of palytoxin analogues in blue humphead parrotfish *Scarus oivifrons* causing human poisoning in Japan." *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 30 (8): 1358-1364. <https://doi.org/10.1080/19440049.2013.790085>.
- Suzuki, T., R. Watanabe, H. Uchida, R. Matsushima, H. Nagai, T. Yasumoto, T. Yoshimatsu, S. Sato et M. Adachi. 2012. "LC-MS/MS analysis of novel ovatoxin isomers in several *Ostreopsis* strains collected in Japan." *Harmful Algae* 20: 81-91. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2012.08.002>.
- Takeuchi A., N. Reyes, P. Artigas, D.C. Gadsby 2009. "Visualizing the mapped ion pathway through the Na,K-ATPase pump." *Channels (Austin)* 3(6):383-6. doi: 10.4161/chan.3.6.9775.
- Tamele, I. J., M. Silva, V. Vasconcelos 2019. "The incidence of marine toxins and the associated seafood poisoning episodes in the african countries of the indian ocean and the red sea." *Toxins* 11(1) : 58. doi: 10.3390/toxins11010058.

- Taniyama, S., O. Arakawa, M. Terada, S. Nishio, T. Takatani, Y. Mahmud et T. Noguchi. 2003. "*Ostreopsis* sp., a possible origin of palytoxin (PTX) in parrotfish *Scarus oivifrons*." *Toxicon* 42 (1): 29-33. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(03\)00097-7](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(03)00097-7).
- Taniyama, S., Mahmud, Y., Terada, M., Takatani, T., Arakawa, O., Noguchi, T., 2002. "Occurrence of a food poisoning incident by palytoxin from a serranid *Epinephelus* sp. in Japan" *Journal of natural toxins* , 11 :277-282.
- Taniyama, S., T. Sagara, S. Nishio, R. Kuroki, M. Asakawa, T. Noguchi, S. Yamasaki, T. Takatani et O. Arakawa. 2009. "Survey of food poisoning incidents in Japan due to ingestion of marine boxfish, along with their toxicity." *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* 50 (5): 270-277. <https://doi.org/10.3358/shokueishi.50.270>.
- Tartaglione, L., E. Dello Iacovo, A. Mazzeo, S. Casabianca, P. Ciminiello, A. Penna et C. Dell'Aversano. 2017. "Variability in Toxin Profiles of the Mediterranean *Ostreopsis* cf. *ovata* and in Structural Features of the Produced Ovatoxins." *Environmental Science and Technology* 51 (23): 13920-13928. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03827>.
- Tartaglione, L., M. Pelin, M. Morpurgo, C. Dell'Aversano, J. Montenegro, G. Sacco, S. Sosa, J. D. Reimer, P. Ciminiello et A. Tubaro. 2016. "An aquarium hobbyist poisoning: Identification of new palytoxins in *Palythoa* cf. *toxica* and complete detoxification of the aquarium water by activated carbon." *Toxicon* 121: 41-50. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.08.012>.
- Tartaglione, L., A. Mazzeo, C. Dell'Aversano, M. Forino, V. Giussani, S. Capellacci, A. Penna, V. Asnaghi, M. Faimali, M. Chiantore, T. Yasumoto et P. Ciminiello. 2016. "Chemical, molecular, and eco-toxicological investigation of *Ostreopsis* sp. from Cyprus Island: Structural insights into four new ovatoxins by LC-HRMS/MS." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408 (3): 915-932. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9183-3>.
- Tatsumi, M., M. Takahashi et Y. Ohizumi. 1984. "Mechanism of palytoxin-induced [3H]norepinephrine release from a rat pheochromocytoma cell line." *Molecular Pharmacology* 25 (3): 379-83.
- Tawong, W., T. Nishimura, H. Sakanari, S. Sato, H. Yamaguchi et M. Adachi. 2014. "Distribution and molecular phylogeny of the dinoflagellate genus *Ostreopsis* in Thailand." *Harmful Algae* 37: 160-171. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.06.003>.
- Tawong, W., T. Yoshimatsu, H. Yamaguchi et M. Adachi. 2015. "Effects of temperature, salinity and their interaction on growth of benthic dinoflagellates *Ostreopsis* spp. from Thailand." *Harmful Algae* 44: 37-45. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.02.011>.
- Taylor, F.J.R. 1979. "Description of the benthic dinoflagellate [Algae] associated with maitotoxin and ciguatoxin, including observations on Hawaiian material. Toxic Dinoflagellate Blooms", Elsevier Scientific, New York (1979), pp. 71-76.
- Ten-Hage, L., J. Turquet, J. P. Quod & A. Couté 2000. "*Coolia areolata* sp. nov. (*Dinophyceae*), a new sand-dwelling dinoflagellate from the southwestern Indian Ocean", *Phycologia*, 39:5,377-383, DOI: 10.2216/i0031-8884-39-5-377.1
- Terajima, T., H. Uchida, N. Abe et T. Yasumoto. 2018. "Simple structural elucidation of ostreocin-B, a new palytoxin congener isolated from the marine dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*, using complementary positive and negative ion liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 32 (12): 1001-1007. <https://doi.org/10.1002/rcm.8130>.
- Terajima, T., H. Uchida, N. Abe et T. Yasumoto. 2019. "Structure elucidation of ostreocin-A and ostreocin-E1, novel palytoxin analogs produced by the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*, using LC/ Q-TOF MS." *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 83 (3): 381-390. <https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1550356>.
- Terao, K. K., E. Ito et T. Yasumoto. 1992. "Light and electron microscopic observation of experimental palytoxin poisoning in mice." *Bulletin de la Société de pathologie exotique* 85 (5 Pt 2): 494-496.
- Ternon, E., M.L. Carter, L. Cancelada, R.H. Lampe, A.E. Allen, C. Anderson, K. Prather, W. Gerwick. 2023. "Yessotoxin production and aerosolization during the unprecedented red tide of 2020 in southern California." *Elementa, Science of the Anthropocene*. Accepté.

- Ternon, E., O. P. Thomas, R. Lemée, and W. H. Gerwick. 2022. "Rapid Biotic and Abiotic Transformation of Toxins produced by *Ostreopsis cf. ovata*" *Marine Drugs* 20, no. 12: 748. <https://doi.org/10.3390/md20120748>
- Ternon, E., E. Glukhov, E. Trytten, R. Lemée et W.H. Gerwick. 2022b. "On the Hunt for New Toxin Families Produced by a Mediterranean Strain of the Benthic Dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata*." *Toxins* 14 (4): 234.
- Ternon, E., A. S. Pavau, A. Peltekis, M. P. Gemin, C. Jauzein, B. Bailleul, R. Lemée et O. P. Thomas. 2022a. "Assessment of the allelochemical activity of *Ostreopsis cf. ovata* and the ovatoxins towards competitive benthic microalgae." *Aquatic Ecology*. <https://doi.org/10.1007/s10452-022-09953-x>.
- Ternon, E., A. S. Pavau, S. Marro, O. P. Thomas et R. Lemée. 2018. "Allelopathic interactions between the benthic toxic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* and a co-occurring diatom." *Harmful Algae* 75: 35-44. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.04.003>.
- Tester, P. A., R. W. Litaker et E. Berdalet. 2020. "Climate change and harmful benthic microalgae." *Harmful Algae* 91. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101655>.
- Tibirica, C.E.J.A., I. P. Leite, T. V. V. Batista, L. F. Fernandes, N. Chomerat, F. Herve, P. Hess et L. L. Mafra, Jr. 2019. "*Ostreopsis cf. ovata* Bloom in Currais, Brazil: Phylogeny, Toxin Profile and Contamination of Mussels and Marine Plastic Litter." *Toxins* (Basel) 11 (8). <https://doi.org/10.3390/toxins11080446>.
- Tichadou, L., M. Glaizal, A. Armengaud, H. Grosse, R. Lemée, R. Kantin, J. L. Lasalle, G. Drouet, L. Rambaud, P. Malfait et L. De Haro. 2010. "Health impact of unicellular algae of the *Ostreopsis* genus blooms in the Mediterranean Sea: Experience of the French Mediterranean coast surveillance network from 2006 to 2009." *Clinical Toxicology* 48 (8): 839-844.
- Toldrà, A., C. Alcaraz, J. Diogène, C. K. O'Sullivan et M. Campàs. 2019. "Detection of *Ostreopsis cf. ovata* in environmental samples using an electrochemical DNA-based biosensor." *Science of the Total Environment* 689: 655-661. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.448>.
- Totti, C., Accoroni, S., Cerino, F., Cucchiari, E., Romagnoli, T., 2010. "*Ostreopsis ovata* bloom along the conero riviera (northern adriatic sea): Relationships with environmental conditions and substrata" *Harmful Algae*, 9:233-239.
- Totti, C., Cucchiari, E., Romagnoli, T., Penna, A., 2007. "Bloom of *ostreopsis ovata* on the conero riviera (NW Adriatic Sea)" *Harmful Algae News*, 33:12-13.
- Tindall, D.R., D.M. Miller, P.M. Tindall 1990. "Toxicity of *Ostreopsis lenticularis* from the British and United States Virgin Islands." Dans *Toxic Marine Phytoplankton*, édité par B. Sundström E. Granéli, L. Edler, D.M. Anderson, 424 – 429.
- Tognetto, L., S. Bellato, I. Moro et C. Andreoli. 1995. "Occurrence of *Ostreopsis ovata* (Dinophyceae) in the Tyrrhenian Sea during Summer 1994." *Botanica Marina* 38 (1-6): 291-296. <https://doi.org/10.1515/botm.1995.38.1-6.291>.
- Tosteson, M.T., D.R. Scriven, A.K. Bharadwaj , Y. Kishi , D.C. Tosteson 1995. "Interaction of palytoxin with red cells: structure-function studies." *Toxicon* 33(6): 799-807. doi: 10.1016/0041-0101(95)00010-j.
- Totti, C., S. Accoroni, F. Cerino, E. Cucchiari et T. Romagnoli. 2010. "*Ostreopsis ovata* bloom along the Conero Riviera (northern Adriatic Sea): Relationships with environmental conditions and substrata." *Harmful Algae* 9 (2): 233-239. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2009.10.006>.
- Tubaro, A., P. Durando, G. Del Favero, F. Ansaldi, G. Icardi, J. R. Deeds et S. Sosa. 2011. "Case definitions for human poisonings postulated to palytoxins exposure." *Toxicon* 57 (3): 478-495. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.01.005>.
- Tubaro, A., G. Del Favero, D. Beltramo, M. Ardizzone, M. Forino, M. De Bortoli, M. Pelin, M. Poli, G. Bignami, P. Ciminiello et S. Sosa. 2011. "Acute oral toxicity in mice of a new palytoxin analog: 42-Hydroxy-palytoxin." *Toxicon* 57 (5): 755-763. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.02.009>.
- Turki, S. 2005. "Distribution of toxic dinoflagellates along the leaves of seagrass *Posidonia oceanica* and *Cymodocea nodosa* from the Gulf of Tunis." *Cahiers de Biologie Marine* 46 (1): 29-34.

- Turki, S., A. Harzallah et C. Sammari. 2006. "Occurrence of harmful dinoflagellates in two different Tunisian ecosystems: The lake of Bizerte and the gulf of Gabès." *Cahiers de Biologie Marine* 47 (3): 253-259.
- Uchida, H., Y. Taira et T. Yasumoto. 2013. "Structural elucidation of palytoxin analogs produced by the dinoflagellate *Ostreopsis ovata* IK2 strain by complementary use of positive and negative ion liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 27 (17): 1999-2008. <https://doi.org/10.1002/rcm.6657>.
- Uemura, D., Y. Hirata, T. Iwashita et H. Naoki. 1985. "Studies on palytoxins." *Tetrahedron* 41(6):1007-1017."
- Uemura, D., K. Ueda, Y. Hirata, H. Naoki et T. Iwashita. 1981a. "Further studies on palytoxin I." *Tetrahedron Letters* 22(20): 1909-1912.
- Uemura, D., K. Ueda, Y. Hirata, H. Naoki et T. Iwashita. 1981b. "Further studies on palytoxin II. structure of palytoxin." *Tetrahedron Letters* 22(20) : 2781-2784.
- Ukena, T., M. Satake, M. Usami, Y. Oshima, T. Fujita, H. Naoki et T. Yasumoto. 2002. "Structural confirmation of ostreocin-D by application of negative-ion fast-atom bombardment collision-induced dissociation tandem mass spectrometric methods." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 16 (24): 2387-2393. <https://doi.org/10.1002/rcm.867>.
- Ukena, T., M. Satake, M. Usami, Y. Oshima, H. Naoki, T. Fujita, Y. Kan et T. Yasumoto. 2001. "Structure elucidation of ostreocin D, a palytoxin analog isolated from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*." *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 65 (11): 2585-2588. <https://doi.org/10.1271/bbb.65.2585>.
- Ungaro, N., A.M. Pastorelli, T. Di Festa, I. Galise, C. Romano, G. Assennato, V. Blonda, V. Perrino, 2010. "Annual trend of the dinoflagellate *Ostreopsis ovata* in two sites along the Southern Adriatic coast." *Biology Marine Mediterranean*. 17:183-184.
- Usami, M., M. Satake, S. Ishida, T. Yasumoto, A. Oue et Y. Kan. 1995. "Palytoxin Analogs from the Dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*." *Journal of the American Chemical Society* 117 (19): 5389-5390. <https://doi.org/10.1021/ja00124a034>.
- Vadász I, Raviv S, Sznajder JI. 2007. "Alveolar epithelium and Na,K-ATPase in acute lung injury." *Intensive Care Med* 34 (2): 214-223. [https://doi.org/doi:10.1016/0041-008x\(75\)90026-5](https://doi.org/doi:10.1016/0041-008x(75)90026-5).
- Vale, C., Gómez-Limia, B., Vieytes, M.R., Botana, L.M., "Mitogen-activated protein kinases regulate palytoxin-induced calcium influx and cytotoxicity in cultured neurons" 2007. *British Journal of Pharmacology.*, 152:256-266.
- Valverde, I., J. Lago, A. Reboreda, J. M. Vieites et A. G. Cabado. 2008a. "Characteristics of palytoxin-induced cytotoxicity in neuroblastoma cells." *Toxicology in Vitro* 22 (6): 1432-1439. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.04.012>.
- Valverde, I., J. Lago, J. M. Vieites et A. G. Cabado. 2008b. "In vitro approaches to evaluate palytoxin-induced toxicity and cell death in intestinal cells." *Journal of Applied Toxicology* 28 (3): 294-302. <https://doi.org/10.1002/jat.1278>.
- Van Acker, E., S. Huysman, M. De Rijcke, J. Asselman, K. A. C. De Schampelaere, L. Vanhaecke et C. R. Janssen. 2021. "Phycotoxin-Enriched Sea Spray Aerosols: Methods, Mechanisms, and Human Exposure." *Environmental Science and Technology* 55 (9): 6184-6196. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c00995>.
- Van Dolah, F. M. 2000. "Marine algal toxins: Origins, health effects, and their increased occurrence." *Environmental Health Perspectives* 108 (SUPPL. 1): 133-141. <https://doi.org/10.1289/ehp.00108s1133>.
- Vanucci, S., F. Guidi, R. Pistocchi et R. A. Long. 2016. "Phylogenetic structure of bacterial assemblages co-occurring with *Ostreopsis cf. ovata* bloom." *Harmful Algae* 55: 259-271. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.04.003>.
- Vanucci, S., L. Pezzolesi, R. Pistocchi, P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, E. D. Iacovo, E. Fattorusso, L. Tartaglione et F. Guerrini. 2012. "Nitrogen and phosphorus limitation effects on cell growth, biovolume, and toxin production in *Ostreopsis cf. ovata*." *Harmful Algae* 15: 78-90. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.12.003>.

- Vassalli, M., Penna, A., Sbrana, F., Casabianca, S., Gjerci, N., Capellacci, S., Asnaghi, V., Ottaviani, E., Giussani, V., Pugliese, L., Jauzein, C., Lemée, R., Hachani, M.A., Turki, S., Açaf, L., Saab, M.A.-A., Fricke, A., Mangialajo, L., Bertolotto, R., Totti, C., Accoroni, S., Berdalet, E., Vila, M., Chiantore, M., 2018. "Intercalibration of counting methods for *Ostreopsis* spp. blooms in the Mediterranean Sea." *Ecological Indicators* 85: 1092-1100.
- Venable, J.H., Coggeshall, R., A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy (1965) *J. Cell. Biol.*, 25, pp. 401-408; Ukena, T., M. Satake, M. Usami, Y. Oshima, H. Naoki, T. Fujita, Y. Kan et T. Yasumoto. 2001. "Structure elucidation of ostreocin D, a palytoxin analog isolated from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*." *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 65 (11): 2585-2588. <https://doi.org/10.1271/bbb.65.2585>.
- Verma, A., M. Hoppenrath, J. J. Dorantes-Aranda, D. T. Harwood et S. A. Murray. 2016. "Molecular and phylogenetic characterization of *Ostreopsis* (Dinophyceae) and the description of a new species, *Ostreopsis rhodesae* sp. nov., from a subtropical Australian lagoon." *Harmful Algae* 60: 116-130. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.11.004>.
- Verma, A., M. Hoppenrath, K. F. Smith, J. S. Murray, D. T. Harwood, J. M. Hosking, T. Rongo, L. L. Rhodes et S. A. Murray. 2023. "*Ostreopsis Schmidt* and *Coolia Meunier* (Dinophyceae, Gonyaulacales) from Cook Islands and Niue (South Pacific Ocean), including description of *Ostreopsis tairoto* sp. nov." *Scientific Reports* 13 (1): 3110. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29969-z>.
- Vick, J. A. et J. S. Wiles. 1975. "The mechanism of action and treatment of palytoxin poisoning." *Toxicology and Applied Pharmacology* 34 (2): 214-223. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(75\)90026-5](https://doi.org/10.1016/0041-008X(75)90026-5).
- Vila, M., Garcés, E., Masó, M., 2001. "Potentially toxic epiphytic dinoflagellate assemblages on macroalgae in the NW Mediterranean". *Aquatic Microbial Ecology*, 26: 51-60.
- Vila, M., R. Abós-Herràndiz, J. Isern-Fontanet, J. Álvarez et E. Berdalet. 2016. "Establishing the link between *Ostreopsis* cf. *Ovata* blooms and human health impacts using ecology and epidemiology." *Scientia Marina* 80: 107-115. <https://doi.org/10.3989/scimar.04395.08A>.
- Vila, M., E. Garcés et M. Masó. 2001. "Potentially toxic epiphytic dinoflagellate assemblages on macroalgae in the NW Mediterranean." *Aquatic Microbial Ecology* 26 (1): 51-60. <https://doi.org/10.3354/ame026051>.
- Vila, M., M. Masó, N. Sampedro, 2008. "The genus *Ostreopsis* in recreational waters of the Catalan Coast and Balearic Islands (NW Mediterranean Sea): is this the origin of human respiratory difficulties?" In: Moestrup Ø. et al. (eds), *Proceedings of the 12th International Conference on Harmful Algae, Copenhagen, Denmark, 4-8 September 2006. ISSHA and IOC of UNESCO*, pp. 334-336.
- Vila, M., L. Arin, C. Battocchi, I. Bravo, S. Fraga, A. Penna, A. Reñé, P. Riobó, F. Rodriguez, M.M. Sala, J. Camp, M. de Torres, J.M. Franco. 2012. "Management of *Ostreopsis* blooms in recreational waters along the Catalan coast (NW Mediterranean Sea): cooperation between a research project and a monitoring program" *Cryptogamie, Algologie* 33 (2): 143-152.
- Vila, M., L. Viure, R. Lemée, E. Berdalet, E. 2022. «Developing an *Ostreopsis* Early Warning System: the joint engagement of scientists, environmental agencies and community science." *Proceedings of the 19th International Conference on Harmful Algae 2021, La Paz, B.C.S., Mexico. International Society for the Study of Harmful Algal Blooms*. 310-315.
- Volpe, G., L. Cozzi, D. Migliorelli, L. Croci, G. Palleschi. 2014. "Development of a haemolytic-enzymatic assay with mediated amperometric detection for palytoxin analysis: application to mussels." *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. ;406(9-10):2399-410. doi: 10.1007/s00216-014-7630-1. Epub 2014 Feb 27. PMID: 24573577.
- Wachi, K. M. et Y. Hokama. 2001. "Diversity of marine biotoxins in the near-shore ocean area: presence of a palytoxin-like entity at Barber's Point Harbor, Oahu." *J Nat Toxins* 10 (4): 317-33.
- Walsh, J. J., J. M. Lenes, R. H. Weisberg, L. Zheng, C. Hu, K. A. Fanning, R. Snyder et J. Smith. 2017. "More surprises in the global greenhouse: Human health impacts from recent toxic marine aerosol formations, due to centennial alterations of world-wide coastal food webs." *Marine Pollution Bulletin* 116 (1-2): 9-40. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.12.053>.

- Wang, X., J.D. Horisberger 1997. "Palytoxin effects through interaction with the Na,K-ATPase in *Xenopus oocyte*." *FEBS Letters* 409(3): 391-395. doi: 10.1016/s0014-5793(97)00559-0.
- Wattenberg, E. V., D. Uemura, K. L. Byron, M. L. Villereal, M. R. Rosner et H. Fujiki. 1989. "Structure-Activity Studies of the Nonphorbol Tumor Promoter Palytoxin in Swiss 3T3 Cells." *Cancer Research* 49 (21): 5837-5842.
- Wieringa, A., D. Bertholee , P. Ter Horst , I. van den Brand , J. Haringman, P. Ciminiello . 2011. "Respiratory impairment in four patients associated with exposure to palytoxin containing coral." *Journal of Emergency Medicine* 2011;40(4):397-9.
- Wiles, J. S., J. A. Vick et M. K. Christensen. 1974. "Toxicological evaluation of palytoxin in several animal species." *Toxicon* 12 (4): 427-433. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(74\)90011-7](https://doi.org/10.1016/0041-0101(74)90011-7).
- Wu, C. H. 2009. "Palytoxin: Membrane mechanisms of action." *Toxicon* 54 (8): 1183-1189. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.02.030>.
- Wu, M.L., C.C Yang , Deng JF, Wang KY (2014). Hyperkalemia, hyperphosphatemia, acute kidney injury, and fatal dysrhythmias after consumption of palytoxin-contaminated goldspot herring. *Ann Emerg Med*. Dec;64(6):633-6. doi: 10.1016/j.annemergmed.2014.06.001.
- Yakes, B. J., S. DeGrasse, M. A. Poli et J. Deeds. 2011. "Antibody characterization and immunoassays for palytoxin using an SPR biosensor." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 400: 2865-2869.
- Yasumoto, T., D. Yasumura, Y. Ohizumi, M. Takahashi, A. C. Alcalá et L. C. Alcalá. 1986. "Palytoxin in two species of xanthid crab from the Philippines." *Agricultural and Biological Chemistry* 50 (1): 163-167.
- Yasumoto, T. 1999. "Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism." *Toxicon*, 37 : 55–65.
- Yasumoto, T., Y. Oshima et M.i Yamaguchi. 1978. "Occurrence of a New Type of Shellfish Poisoning in the Tohoku District." *NIPPON SUISAN GAKKAISHI* 44 (11): 1249-1255. <https://doi.org/10.2331/suisan.44.1249>.
- Yamaguchi, H., Y. Tomori, Y. Tanimoto, O. Oku et M. Adachi. 2014. "Evaluation of the effects of light intensity on growth of the benthic dinoflagellate *Ostreopsis* sp. 1 using a newly developed photoirradiation-culture system and a novel regression analytical method." *Harmful Algae* 39: 48-54. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.06.011>.
- Yoshimine, K., S. Orita, S. Okada, K. Sonoda, K. Kubota et T. Yonezawa. 2001. "Two cases of parrotfish poisoning with rhabdomyolysis." *Nihon Naika Gakkai zasshi. The Journal of the Japanese Society of Internal Medicine* 90 (7): 1339-1341. <https://doi.org/10.2169/naika.90.1339>.
- Yoshizumi M., H. Houchi , Y. Ishimura , Y. Masuda , K. Morita , M. Oka 1991a. "Mechanism of palytoxin-induced Na⁺ influx into cultured bovine adrenal chromaffin cells: possible involvement of Na⁺/H⁺ exchange system." *Neuroscience Letters* 2; 130(1):103-6. doi: 10.1016/0304-3940(91)90238-o.
- Yoshizumi, M., A. Nakanishi , H. Houchi , K. Morita , I. Katoh , M. Oka 1991b. "Characterization of palytoxin-induced catecholamine secretion from cultured bovine adrenal chromaffin cells. Effects of Na⁺- and Ca²⁺-channel blockers." *Biochemical Pharmacology* 42(1): 17-23. doi: 10.1016/0006-2952(91)90675-u.
- Zendong, Z., C. Herrenknecht, E. Abadie, C. Brissard, C. Tixier, F. Mondeguer, V. Séchet, Z. Amzil et P. Hess. 2014. "Extended evaluation of polymeric and lipophilic sorbents for passive sampling of marine toxins." *Toxicon* 91: 57-68. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.03.010>.
- Zingone, A., L. Escalera, K. Aligizaki, M. Fernández-Tejedor, A. Ismael, M. Montresor, P. Mozetič, S. Taş et C. Totti. 2021. "Toxic marine microalgae and noxious blooms in the Mediterranean Sea: A contribution to the Global HAB Status Report." *Harmful Algae* 102. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101843>.

12.2 Rapport

- Afssa. 2007. Appui scientifique et technique de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la consommation de produits de la mer en présence d'*Ostreopsis ovata*.
- Afssa. 2008. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la pertinence de compléter le dispositif général de surveillance du milieu marin et des aliments mis sur le marché par la prise en compte de la microalgue épibenthique *Ostreopsis*.
- Anses. 2017. Valeurs toxicologiques de référence (VTR). Guide d'élaboration de VTR de l'Anses. Rapport d'expertise collective. Juin 2017. Maisons-Alfort, 186 p.
- Anses. 2021. Etat des connaissances relatives à l'exposition aux brevetoxines par la consommation de coquillages, par l'inhalation d'embruns ou par contact en cas de baignade ou de pratique d'activités nautiques (saisine n°2020-SA-0020). Maisons-Alfort : Anses, 210 p.
- Anses. 2023. Avis relatif à l'élaboration d'une VTR pour la palytoxine. (saisine 2021-SA-212). Maisons-Alfort : Anses, 20 p
- Direction générale de la santé (DGS). 2010. Note de service DGS/EA3/EA4 n o 2010-238 du 30 juin 2010 relative à la surveillance sanitaire et environnementale et aux modalités de gestion des risques sanitaires pour la saison balnéaire 2010, liés à la présence de la microalgue toxique *Ostreopsis* spp. dans les eaux de baignade en méditerranée et à la contamination par ses toxiques des produits de la mer issus de la pêche de loisir.
- Direction générale de la santé (DGS). Note de service DGS/EA4 n o 2009-196 du 7 juillet 2009 relative à la surveillance sanitaire et environnementale à mettre en œuvre par les préfets des départements du pourtour méditerranéen français pendant la saison balnéaire 2009 pour prévenir l'apparition de cas humains liés à la présence de la microalgue toxique *Ostreopsis* spp. dans les eaux de baignade
- EFSA. Panel on Contaminants in the Food Chain. 2010. Statement on further elaboration of the consumption figure of 400 g shellfish meat on the basis of new consumption data. *EFSA Journal*; 1706:20 pp
- Efsa Panel on Contaminants in the Food Chain (2009). "Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Palytoxin group." *EFSA Journal* 7(12).
- Reguera, B., Alonso, R., Moreira, A., Méndez, S., Dehraoui-Bottein, M.-Y. (Eds). 2016. Guide for designing and implementing a plan to monitor toxin-producing micro algae. 2nd Ed. Intergovernmental Oceanographic Commission (IOC) of UNESCO and International Atomic Energy Agency (IAEA), Paris and Vienna. IOC Manuals and Guides, no. 59. 66 pages (Spanish and English).

12.3 Normes

NF EN 15204, Qualité de l'eau – Norme guide pour le dénombrement du phytoplancton par microscopie inversée (méthode d'Utermöhl). Parue en décembre 2006.

NF EN 15972, Guide pour l'étude quantitative et qualitative du phytoplancton marin. Parue en décembre 2011.

ANNEXES

Annexe 1 : Lettre de saisine



2021-SA-0212

Ministère de l'Agriculture
et de l'Alimentation
Direction générale de l'alimentation

Ministère des Solidarités
et de la Santé
Direction générale de la santé

Nos réf. : D-21-029006

Paris, le **- 3 DEC. 2021**

Le directeur général de l'alimentation
Le directeur général de la santé

à

Monsieur le Directeur Général
de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de
l'alimentation, de l'environnement et du travail

4 rue Pierre et Marie Curie
94701 Maisons-Alfort Cedex

Objet : Demande d'avis de l'Anses relatif aux risques liés aux efflorescences d'*Ostreopsis* spp. sur l'ensemble du littoral français

Durant le mois d'août 2021, plus de 600 personnes ont déclaré des symptômes d'intoxication après avoir fréquenté des plages de la côte basque. Ces intoxications ont été mises en relation avec une efflorescence d'un dinoflagellé phytoplanctonique du genre *Ostreopsis*. Cette microalgue benthique avait déjà été signalée dès septembre 2020 sur la côte basque.

À la suite d'un épisode d'efflorescence d'*Ostreopsis* spp. dans l'eau de mer, l'exposition par voie respiratoire (contact avec les embruns lors de promenade, de surveillance des plages...), par contact cutané avec de l'eau de mer (baignade, activité nautique...) ou par ingestion (notamment par la consommation de produits de la mer contaminés par les toxines d'*Ostreopsis* spp.) est susceptible de provoquer des manifestations cliniques polymorphes telles que : toux, rhinorrhée, irritations de la sphère ORL et des yeux, céphalées, fièvre, difficultés respiratoires, nausées, vomissements, diarrhées, douleurs abdominales, myalgies, rougeurs, démangeaisons ou saignements de nez. Lors de ce dernier épisode, certains cas graves d'intoxications ont nécessité des hospitalisations.

L'augmentation brutale du nombre de cas enregistrés par le Centre antipoison et de toxicovigilance (CAP-TV) de Bordeaux en août 2021 a conduit à prendre des mesures de gestion immédiates sur les plages de la côte basque, alors même que l'espèce exacte d'*Ostreopsis* et la (les) toxine(s) incriminée(s) n'étaient pas encore identifiées : fermeture temporaire de plages (pendant quelques jours), information du public (notamment par le biais d'affichage et de communiqués de presse), sensibilisation et mobilisation du corps médical pour identifier les cas.

251 rue de Vaugirard – 75732 Paris cedex 15 – Tél. 01 49 55 49 55 – www.sanboliviers.bordeaux.fr
14 avenue Duquesne – 75350 Paris 07 SP - Tél. 01 40 56 60 00 - www.social-sante.gov.fr

Le traitement de vos données est nécessaire à la gestion de votre demande et entre dans le cadre des missions confiées aux ministères sociaux.
Conformément au règlement général sur la protection des données (RGPD), vous pouvez exercer vos droits à l'adresse droit-accès@anses.fr ou par voie postale.
Pour en savoir plus : <https://www.anses.fr/fr/information/140186/140186>

Une efflorescence d'*Ostreopsis* de moindre amplitude avait déjà été signalée pendant l'été 2020 sur la côte basque. Aucun cas humain n'avait été rapporté. Il est donc possible que le phénomène émergent devienne récurrent et puisse s'amplifier. Par conséquent, l'expertise de l'Anses est rendue nécessaire par l'émergence de cette problématique sur la côte atlantique, alors qu'elle était jusque-là rencontrée sur le seul littoral méditerranéen, et par l'importance du nombre de cas signalés (le plus important de l'ensemble des épisodes rencontrés en France métropolitaine).

L'objectif est, d'une part, la mise à jour des données relatives aux microalgues du genre *Ostreopsis* et, d'autre part, l'établissement de recommandations spécifiques à la côte atlantique ainsi que, si cela s'avère opportun, la mise à jour des recommandations spécifiques à la côte méditerranéenne établies en 2007-2008. Enfin, cette saisine porte sur les risques sanitaires liés aux diverses voies d'exposition : par l'air (exposition aux embruns), par la consommation de produits de la mer contaminés et par les activités aquatiques, tout en prenant en considération les particularités liées à la protection des travailleurs concernés.

Contexte :

Les dinoflagellés du genre *Ostreopsis* sont connus en zones côtières tropicales pour être à l'origine d'intoxications alimentaires (souvent mortelles) suite à l'accumulation de la palytoxine et/ou de ses analogues (palytoxines-like) dans des crabes, des oursins ou des poissons. Probablement en lien avec le changement climatique, *Ostreopsis* spp. est de plus en plus présent en Méditerranée nord occidentale (Italie, Espagne, Grèce).

Avant septembre 2020, la présence de micro-algues du genre *Ostreopsis* n'était connue en métropole que sur la côte méditerranéenne. En 2006, année de la première prolifération d'*Ostreopsis* sp en Méditerranée, les signalements de cas d'irritation cutanéomuqueuse chez des plongeurs avaient conduit à réaliser des analyses d'eau, révélant la présence d'*Ostreopsis ovata*. Cette espèce, alors émergente en Méditerranée, est capable de produire une toxine appartenant à la famille des « palytoxine-like ».

La palytoxine est une toxine très puissante produite par des coraux mous et par certaines espèces d'*Ostreopsis*. D'autres toxines analogues à la palytoxine mais moins toxiques sont également produites par des espèces d'*Ostreopsis*. Les « palytoxines-like » regroupent ainsi 8 analogues : la palytoxine au sens strict (*a priori* la plus toxique), l'ostreocin-D, l'ovatoxine-A, l'homopalytoxine, la bishomopalytoxine, la neopalytoxine, la deopalytoxine et la 42-hydroxypalytoxine.

Par ailleurs, les données acquises, durant les blooms estivaux d'*Ostreopsis* cf. *ovata* de 2008 et 2009, montrent qu'il existe un danger réel d'intoxication humaine suite à la mise en évidence d'une bio-accumulation des PLT-like (palytoxine + ovatoxine-a) aussi bien dans les bivalves filtreurs (moules immergées) que dans les échinodermes herbivores (oursins). La teneur totale en PLT-like accumulée dans les oursins a atteint 450 µg eq PLT/kg de chair totale (été 2008). Concernant les moules, la teneur maximale était de 230 µg eq PLT/kg (été 2009) pour un maximum de 360 µg trouvé dans les oursins durant la même période au niveau du même site.

La palytoxine s'accumulant potentiellement dans les produits de la mer, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (devenue Anses) avait été saisie pour établir un bilan des connaissances réparti dans deux avis scientifiques et techniques :

- L'avis scientifique et technique du 22/08/2007 (saisine n°2007-SA-0227¹) apporte des bilans de connaissance relatives :
 - o aux toxines produites par les microalgues du genre *Ostreopsis* (dont *ovata* et *siamensis*) ;
 - o à la possibilité de transfert dans la chaîne alimentaire des toxines produites par les microalgues du genre *Ostreopsis* ;
 - o aux méthodes d'analyse, biologiques et physicochimiques, utilisables en routine ou en développement (recherche) ;
 - o aux seuils de toxicité connus, et l'Afssa avait conclu qu'il n'en existait pas pour la palytoxine et les palytoxine-like.

¹ <https://www.anses.fr/fr/system/files/RCCP2007sa0227.pdf>

- L'avis du 11/07/2008 (saisine n°2007-SA-0303² liée à la saisine précédente) apporte les informations complémentaires relatives :
 - o à des pistes d'amélioration du dispositif de surveillance d'*Ostreopsis* spp dans le milieu marin et dans les aliments ;
 - o aux études nécessaires pour mieux caractériser le risque alimentaire.

Par ailleurs, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) a rendu en 2009 un avis sur les toxines de la famille des « palytoxine-like »³. L'avis souligne le manque de données de toxicité, mais propose une dose de toxicité aiguë (ARfD) de 0,2 µg/kg de poids corporel, ce qui correspond à un seuil dans l'aliment à ne pas dépasser de 30 µg/kg (somme de la palytoxine et de l'ostreocine-D).

A la lumière des avis de l'Afssa sus-visés et afin de prévenir la survenue de cas d'intoxication liés à la présence d'*Ostreopsis ovata* en Méditerranée, une note de service DGS⁴ a été diffusée courant septembre 2010. Cette instruction propose des modalités de surveillance, de gestion des efflorescences et de communication. Toutefois, si elle cible l'ensemble des espèces du groupe *Ostreopsis*, elle ne porte que sur la problématique rencontrée en Méditerranée, rendant difficile son application lors de l'épidémie survenue sur la côte basque en août dernier. Une mise à jour de celle-ci pourrait donc s'avérer nécessaire, impliquant une actualisation des connaissances scientifiques relatives aux *Ostreopsis* spp et à leurs toxines.

Portée de la saisine :

Conformément à l'article R. 1313-1 du code de la santé publique, nous sollicitons donc l'Anses pour répondre aux questions suivantes :

- Quelles sont les nouvelles données scientifiques publiées depuis les précédents avis, relatives à la fois aux microalgues du genre *Ostreopsis*, et également aux toxines qu'elles produisent ? Quels sont les niveaux de toxicité connus pour les différentes toxines produites ? Quelles sont les conditions favorables pour que les microalgues du genre *Ostreopsis* libèrent des toxines ? L'intoxication humaine est-elle liée à une exposition directe aux toxines, ou survient-elle lors de l'exposition aux microalgues qui produisent ensuite les toxines ? Quels sont les risques pour les différents usagers de la mer selon les différentes voies d'exposition (alimentaire, activités aquatiques, embruns) ?
- Quelles sont les conditions environnementales favorables au développement des différentes espèces du genre *Ostreopsis* ? Quelle est la répartition et la dynamique des populations d'*Ostreopsis* sur les côtes françaises ? Est-il envisageable à court ou moyen terme d'établir une cartographie du risque d'efflorescence d'*Ostreopsis* spp. sur les côtes métropolitaines ? Un plan exploratoire est-il nécessaire pour établir cette cartographie ? Si oui, quelles devraient en être les lignes directrices ?
- Sur la base de l'expérience acquise en Méditerranée, quelles sont les préconisations en matière de méthodologie de prélèvement et d'analyse pour surveiller l'apparition d'*Ostreopsis* sur la côte atlantique ? Dans quelles conditions la recherche du paramètre « *Ostreopsis* spp. » doit-elle être intégrée au contrôle sanitaire des eaux de baignade ?
- Quel est le seuil de concentration d'*Ostreopsis* dans l'eau / de toxines dans l'air ou les aliments devant déclencher une alerte sur la côte atlantique ? Quelles sont les recommandations en matière de mesures de gestion en cas de dépassement de ces seuils ? Existe-t-il des espèces indicatrices, plus aisément identifiables en routine, susceptibles d'alerter sur la présence de microalgues du genre *Ostreopsis* ?
- Existe-t-il dans d'autres pays des méthodes de détection rapides qui pourraient être mises en œuvre pour identifier la toxine en cause lors d'une épidémie ?

² <https://www.anses.fr/fr/system/files/RCCP2007sa0303.pdf>

³ <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2009.1393>

⁴ Note de service DGS/EA3/EA4 n° 2010-238 du 30 juin 2010 relative à la surveillance sanitaire et environnementale et aux modalités de gestion des risques sanitaires pour la saison balnéaire 2010, liés à la présence de la microalgue toxique *Ostreopsis* spp. dans les eaux de baignade en méditerranée et à la contamination par ses toxiques des produits de la mer issus de la pêche de loisir : https://solidarites-sante.gouv.fr/fichiers/bo/2010/10-08/sie_20100008_0100_0161.pdf

- En matière de sécurité des travailleurs, quelles sont les recommandations spécifiques pour éviter une exposition chronique en cas d'efflorescence ?

Délai souhaité :

Afin d'anticiper au mieux les risques potentiels d'intoxication au cours de l'été 2022 et en l'absence de recommandations existantes pour la côte atlantique, une réponse est souhaitée au plus tard le 1/04/2022. L'agence demeure libre de répartir les différentes questions sous plusieurs numéros de saisine, et pourra en particulier rendre son avis sur la mise à jour des recommandations pour la côte méditerranéenne dans un second temps.

Nos services se tiennent à votre disposition pour vous apporter toute information complémentaire.

Nous vous remercions de bien vouloir accuser réception de la présente demande en nous précisant le ou les comités d'experts spécialisés qui sont saisis du dossier.

Le directeur général
de l'alimentation

Bruno FERREIRA

BRUNO
FERREIR
A ID

Signature
numérique de
BRUNO FERREIRA
ID
Date : 2021.12.03
09:11:27 +01'00'

Le directeur général
de la santé

Jérôme SALOMON



Annexe 2 : Résultats des lésions observées après inhalation d'aérosols de PLTX, de 42-OH- PLTX ou d'OVTX chez le rat

Tableau XVIII : Résultats des lésions observées après inhalation d'aérosols de PLTX chez le rat ; N= pas d'effet observé, O= effet observé (d'après Poli *et al.*, 2018).

| Rat | Tem ps | Nécrose voies aériennes pulmonaires/ alvéolaires | Fibrine pulmonaire | Inflammation pulmonaire | Nécrose/ dégradation épithélium nasal | Nécrose/ dégradation cardiomyocytes | Inflammation myocarde | Nécrose/ dégradation hépatocytes | Nécrose lymphoïde | Nécrose/ dégradation tubules rénaux | Nécrose glandes salivaires | Autres |
|-----|--------|--|--------------------|-------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------|----------------------------------|-------------------|-------------------------------------|----------------------------|---|
| 1-1 | 0 | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | |
| 1-2 | 0 | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | |
| 1-3 | 0 | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | |
| 1-4 | 0 | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | |
| 2-1 | 12 | O | O | O | O | O | N | N | O | N | O | |
| 2-2 | 12 | O | O | O | N | O | N | N | O | O | O | |
| 2-3 | 12 | O | O | O | O | O | N | N | O | O | O | Nécrose focale du muscle squelettique |
| 2-4 | 12 | O | O | O | O | O | N | N | O | O | O | |
| 3-1 | 24 | O | O | O | O | O | N | O | O | O | O | |
| 3-2 | 24 | O | O | O | O | O | N | O | O | O | O | |
| 3-3 | 24 | O | O | O | O | O | N | O | O | O | O | |
| 3-4 | 24 | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | |
| 4-1 | 36 | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | |
| 4-2 | 36 | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | Hémorragie unilatérale de l'oreille moyenne |
| 4-3 | 36 | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | |

Tableau XIX: Résultats des lésions observées après inhalation d'aérosols de 42-OH- PLTX chez le rat ; N= pas d'effet observé, O= effet observé (d'après Poli *et al.*, 2018)

| Rat | Temps | Nécrose voies aériennes pulmonaires/ alvéolaires | Fibrine pulmonaire | Inflammation pulmonaire | Nécrose/dégénérescence épithélium nasal | Nécrose/dégénérescence cardiomyocytes | Inflammation myocarde | Nécrose/dégénérescence hépatocytes | Nécrose lympholde | Nécrose/dégénérescence tubules rénaux | Nécrose glandes salivaires |
|-----|-------|--|--------------------|-------------------------|---|---------------------------------------|-----------------------|------------------------------------|-------------------|---------------------------------------|----------------------------|
| 1-1 | 0 | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N |
| 1-2 | 0 | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N |
| 1-3 | 0 | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N |
| 1-4 | 0 | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N |
| 2-1 | 12 | O | O | O | O | N | N | N | O | O | O |
| 2-2 | 12 | O | O | O | O | O | N | O | O | N | O |
| 2-3 | 12 | O | O | O | O | N | N | N | O | O | N |
| 2-4 | 12 | O | O | O | O | O | N | N | O | O | O |
| 2-5 | 12 | O | O | O | O | N | N | O | O | O | O |
| 2-6 | 12 | O | O | O | O | O | N | N | O | O | O |
| 2-7 | 12 | O | O | O | O | O | N | O | O | O | O |

Tableau XX : Résultats des lésions observées après inhalation à des aérosols d'OVTX purifiées chez le rat ; N= pas d'effet observé, O= effet observé (d'après Poli *et al.* 2018)

| Rat | Temps | Nécrose voies aériennes pulmonaires/alvéolaires | Fibrine pulmonaire | Inflammation pulmonaire | Nécrose dégénérescence épithélium nasal | Dégénérescence cardiomyocytes | Inflammation myocarde | Nécrose/dégénérescence hépatocytes | Déplétion, nécrose lympholde | Nécrose/Dégénérescence tubules rénaux | Nécrose/dégénérescence glandes salivaires |
|-----|-------|---|--------------------|-------------------------|---|-------------------------------|-----------------------|------------------------------------|------------------------------|---------------------------------------|---|
| 1-1 | 0 | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N |
| 1-2 | 0 | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N |
| 1-3 | 0 | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N |
| 1-4 | 0 | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N |
| 2-1 | 12 | O | O | O | N | O | N | N | O | N | O |
| 2-2 | 12 | O | O | O | N | O | N | N | O | N | N |
| 2-3 | 12 | O | O | O | N | O | N | N | O | N | N |
| 2-4 | 12 | N | O | O | O | O | N | N | O | N | O |
| 3-1 | 24 | O | O | O | O | O | O | O | O | N | O |
| 3-2 | 24 | O | O | O | O | O | O | N | O | N | O |
| 3-3 | 24 | O | O | O | O | O | O | N | O | N | O |
| 3-4 | 24 | O | O | O | O | O | O | O | O | N | O |
| 4-1 | 36 | O | O | O | O | O | O | O | O | N | O |
| 4-2 | 36 | O | O | O | O | O | O | O | O | N | O |
| 4-3 | 36 | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O |
| 4-4 | 36 | O | O | O | O | O | O | N | O | O | O |
| 5-1 | 48 | O | O | O | O | N | N | O | O | N | O |
| 5-2 | 48 | O | O | O | O | O | O | O | O | N | O |
| 5-3 | 48 | O | O | O | O | O | O | N | O | N | N |
| 5-4 | 48 | O | O | O | O | O | O | O | O | N | O |

Annexe 3 : Tableau synoptique des méthodes et stratégies de prélèvements d'aérosols pour les analyses de toxines, *in situ* ou en milieu contrôlé

Tableau XXI : Tableau synoptique des méthodes et stratégies de prélèvements d'aérosols marins (et lacustres) pour les analyses de toxines, *in situ*, lors d'épisodes de prolifération

| | | | | |
|--------------------------|--|---|--|--|
| Pays et lieu (référence) | Espagne, côte Catalane (Casabianca <i>et al.</i> 2013) | Italie, Toscane (Ciminiello <i>et al.</i> , 2014) | USA, Floride (Pierce <i>et al.</i> , 2005 ; Kirkpatrick <i>et al.</i> , 2010 ; Cheng <i>et al.</i> , 2005, Backer <i>et al.</i> , 2005 ; Fleming <i>et al.</i> , 2009) | USA, Massachusetts (Sutherland <i>et al.</i> , 2021) |
| Espèce/toxine cible | <i>Ostreopsis cf ovata</i> ; <i>O. cf. siamensis</i> ; palytoxin | <i>Ostreopsis cf. ovata</i> , <i>ovatoxine</i> | <i>Karenia brevis</i> , Brévéttoxines, BTX-1- 3 | Cyanobactéries, Anatoxine (ATX) |
| Site | Plage : 0,5 m au-dessus de l'eau Restaurant : 3 m de l'eau | 10 m du bord de mer | Plage de Siesta et Lido : 50-100 m des points de surf | Bord d'un bassin naturel d'eau douce |
| Date | 17-19 août 2010 | 15 juillet- 30 août 2009 et 2010 | Plusieurs études entre 2005-2011 | Septembre 2019 |
| Réplicats | 2 x 6 | 23 en 2009 ; 10 en 2010 | 3 jours, 8 appareils | 2 réplicats/jour durant 5 jours |
| Vent | 10-16 m/s vents marins | Vents faibles : 0,05-2,6 m/s | marin (jour 1 et 2) et vent de terre (jour 3) | Fort vents |
| Appareil | Échantillonneur grand volume (CAV-A7mb, Barcelona) | AirCube COM2 et SAS PCR (impinger dans 50 ml liquide) | Echantillonneur grand volume (TE-5000, Tisch ; G2000H Andersen Instrument, Smyrna, GA) | Prototype grand volume (ASD) |
| Débit | 500 L/min | 10 L/min et 30 L/min | 1,6-2 m ³ /min | nd |
| Durée | 6-7 h | 2-3h | 3h30-9 h | 15-49 h |
| Volume | 166-269 m ³ | 1.2 – 5.4 m ³ | nd | 6-20 m ³ |

| | | | | |
|--------------------------|---|---|--|---|
| Support | Filtre quartz, 15 cm | Filtre verre/quartz, 47 mm | Filtre fibre de verre, 20x28 cm | Filtre fibre de verre, 37 mm |
| Fraction | inhalable | inhalable | inhalable | |
| Pré-traitement du filtre | Ethanol ; méthanol | Ethanol | acétone | Acétonitrile + billes |
| Analyse | PCR | PCR et LC-HRMS | LC-MS | LCMS/MS |
| Résultats | 1-102 cellules/filtre 0.12-1.12 palytoxine (pg/cell) par qPCR 0,11-1,23 pg/cell par microscopie | Détection de <i>O. ovata</i> (< 1 cell/filtre par PCR). Quantification d'Ovatoxine-a (2,4 pg/L d'air) possible que pour 1 jour (sans vent) | Brévétotoxines transportées jusqu'à 6.4 km du bord de mer. Pas de corrélation entre concentrations de brévétotoxines dans l'air et l'eau. Dans toutes les études les concentrations en BTX varient de 1-80 ng/m ³ La direction du vent est le facteur le plus important pour expliquer les concentrations aéroportées de brévétotoxines, avec une augmentation lors des jours de vent de mer | ATX, 0,16 ng/m ³ , uniquement lors de fort vent SSO + brouillard |

Nd : non déterminé

Tableau XXII : Tableau synoptique des méthodes de prélèvements d'aérosols en milieu contrôlé (laboratoire)

| | | |
|--------------------------|---|---|
| Pays et lieu (référence) | Espagne, côte Catalane (Medina-Pérez, 2020) | Belgique (Van Acker <i>et al.</i> , 2021) |
| Espèce/toxine cible | <i>Ostreopsis cf. ovata</i> ; <i>O. cf. siamensis</i> ; palytoxin | Phycotoxines (OA, h--YTX et DTX-1) |
| Site | Eau avec > 200 000 cell/g macroalgues | Eau de mer artificielle enrichie avec des toxines et eau de mer naturelle. Qqs mesures <i>in situ</i> . |
| Date | Juillet-août 2019 | Juillet 2017 |
| Réplicats | Prélèvements après 0,75, 4 et 21 h | 8 |

| | | |
|-----------------------|---|---|
| Conditions | 75 ?? L d'eau avec système de formation de bulles et soufflage d'air comprimé au-dessus. Collecte d'air avec un échantillonneur de PM1 | Dans aquarium de 210 L, pas entièrement rempli. Système de génération de bulles par intermittence. Ajout de microalgues <i>Prorocentrum lima</i> et <i>Prorocentrum reticulatum</i> . |
| Appareil | Échantillonneur PM1 | Filtre dans une cassette relié à une pompe |
| Débit | 37 L.min ⁻¹ | 9 L.min ⁻¹ |
| Durée | 0,75- 21 h | 12 h |
| Volume | nd | nd |
| Support | Filtre quartz, 47 mm | Filtre fibre de verre, ou de quartz 47 mm |
| Fraction | PM1 | >5 µm ; 0,2-5 µm, < 0,2 µm (par filtration) |
| Traitement des filtre | -80°C | M HNO ₃ |
| Analyse | UHPLC-HRMS | UHPLC-HRMS |
| Commentaire | Mesure en parallèle des toxines dans l'eau | Conditions artificielles de prolifération |
| Résultats | Quantification de OVTX-a, b, c, d, e. Pas de corrélation entre les concentrations de toxines dans l'eau et dans l'air ou corrélation négative | Le potentiel d'aérosolisation des phycotoxines a été mis en évidence par leur enrichissement de 78 à 1769 fois dans les embruns par rapport à l'eau de subsurface. |

nd : non déterminé



anses

AGENCE NATIONALE DE SÉCURITÉ SANITAIRE
de l'alimentation, de l'environnement et du travail

14 rue Pierre et Marie Curie 94701 Maisons-Alfort Cedex
Tél : 01 42 76 40 40
www.anses.fr — @Anses_fr