

anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Contamination des requins, notamment tigre et bouledogue, par des ciguatoxines : occurrence, méthodes analytiques, cas humains rapportés et éléments d'éthologie

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective

Août 2014

Édition scientifique

Edition révisée en janvier 2015



anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



État des connaissances relatives à la contamination des requins, notamment tigre et bouledogue, par des ciguatoxines : occurrence, méthodes analytiques, cas humains rapportés et éléments d'éthologie pour ces deux espèces de requins

Avis de l'Anses

Rapport d'expertise collective

Août 2014

Édition scientifique

Édition révisée en janvier 2015



Le directeur général

Maisons-Alfort, le 6 janvier 2015

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

relatif à l'évaluation du risque lié à la consommation de deux espèces de requins à La Réunion, notamment vis-à-vis du risque lié aux ciguatoxines

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 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 rendus publics.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Le département de La Réunion dispose depuis 1966 d'une réglementation spécifique (par arrêté préfectoral) qui restreint ou interdit la commercialisation de certaines espèces de poissons en raison du risque d'intoxication par des biotoxines marines, en particulier des ciguatoxines. Parmi ces espèces de poissons figurent depuis 1999 la plupart des espèces de requins, notamment celles de la famille des *Carcharhinidae*.

Le Préfet de La Réunion a sollicité la Direction générale de l'Alimentation (DGAL) afin que soit réévalué le risque lié à deux espèces de requins aujourd'hui interdites à la consommation par cet arrêté préfectoral. Il s'agit du requin tigre (*Galeocerdo cuvier*) et du requin bouledogue (*Carcharhinus leucas*).

Afin d'acquérir des données de contamination de ces deux espèces de requins par les ciguatoxines, les services de la préfecture de La Réunion ont lancé une campagne de prélèvements en 2012 portant sur 12 spécimens par espèce avec recherche de ciguatoxines par bio-essai sur souris. Cette campagne de prélèvements a été étendue en 2013 avec un objectif de 45 spécimens supplémentaires par espèce.

A ce jour, 24 spécimens ont fait l'objet d'analyses de ciguatoxines par bio-essai sur souris et 5 d'entre eux ont également fait l'objet d'analyses de métaux lourds (plomb, cadmium, mercure).

L'Anses a été saisie le 14 octobre 2013 par la DGAL afin de répondre aux questions suivantes :

Question 1: Quelles sont les connaissances actuelles quant à la contamination par des ciguatoxines de la chair de requins, en particulier les requins tigre et bouledogue? Des cas d'intoxications alimentaires associées à la consommation de requins ont-ils déjà été rapportés?

**** avis révisé qui annule et remplace les versions précédentes datées du 6 août 2014 et du 9 juillet 2014.**

Question 2 : Quelles sont les méthodes analytiques actuellement applicables à la détection et à la quantification des ciguatoxines dans la chair de requins? Les résultats issus de ces méthodes peuvent-ils être utilisés pour mener une évaluation des risques sanitaires liés à une éventuelle autorisation de ces espèces pour la consommation humaine dans cette zone?

Dans le cas où l'Anses identifierait une méthode d'analyse des ciguatoxines dans la chair de requins suffisamment fiable, quelles données seraient nécessaires pour mener cette évaluation et quelles recommandations pourraient être émises concernant le protocole de prélèvement du requin tigre et du requin bouledogue à La Réunion? Il sera notamment pris en compte la zone géographique concernée et l'éthologie de ces deux espèces de requins en termes de capacité de déplacements dans les eaux marines réunionnaises.

Question 3 : En 2006 et 2009, l'Agence a rendu des avis relatifs à la consommation des poissons prédateurs pélagiques à La Réunion vis-à-vis du risque sanitaire lié au méthylmercure. Les nouvelles analyses réalisées en 2013 sur des spécimens de requins sont-elles de nature à réviser les conclusions de ces avis?

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

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

L'expertise relève du domaine de compétences du Comité d'experts spécialisé « Evaluation des risques physico-chimiques dans les aliments » (CES ERCA). L'Anses a confié l'instruction de cette saisine au groupe de travail « ciguatoxines », constitué par décision du 19 décembre 2013, pour les questions 1 et 2 ayant trait aux ciguatoxines. Concernant la question 3, relative aux travaux antérieurs de l'Agence sur les risques sanitaires liés au méthylmercure, un travail initialement réalisé en interne à l'Anses, au sein de la direction de l'évaluation des risques, a été présenté au CES ERCA le 26 juin 2014. Les travaux du groupe de travail ont été présentés au CES ERCA tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques lors des réunions plénières du 19 novembre 2013, 17 mars 2014, 14 avril 2014, 26 juin 2014. L'ensemble des travaux a été adopté par le CES ERCA en réunion plénière le 26 juin 2014 et par voie télématique le 3 juillet 2014. Une mise à jour des travaux a été adoptée par le président du CES ERCA par voie télématique le 25 juillet 2014, suite à la réception d'informations complémentaires le 21 juillet 2014.

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 rendues publiques *via* le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES

Le Comité d'experts spécialisé « Evaluation des risques physico-chimiques dans les aliments » (CES ERCA) a adopté le rapport d'expertise collective réalisé par le groupe de travail « ciguatoxines » figurant en annexe du présent avis et dont une synthèse est présentée ci-après.

- **Question 1 concernant les connaissances actuelles quant à la contamination par des ciguatoxines de la chair de requins, en particulier les requins tigre et bouledogue, et aux cas rapportés d'intoxications alimentaires associées à la consommation de requins**

L'analyse de la littérature scientifique et plus largement une recherche sur internet ont permis au groupe de travail d'identifier et de décrire dans son rapport des cas d'intoxications alimentaires associées à la consommation de requins (viande et/ou foie) du XIX^{ème} siècle à nos jours. Des cas, parfois mortels, ont ainsi été rapportés en Nouvelle Calédonie, dans les îles Cook, les îles Gilbert,

en Polynésie Française, à Madagascar (notamment en novembre 2013 et février 2014) et à La Réunion (en 1993). Le requin tigre était l'espèce mise en cause dans les îles Gilbert. Par ailleurs, cette espèce a été décrite dans la littérature comme « ciguatérique », sur la base de données recueillies dans les îles Samoa, Fiji et Mascareignes (Les Mascareignes sont un archipel de l'océan Indien formé de trois îles principales, La Réunion, Maurice et Rodrigues, ainsi que plusieurs petites îles proches). A Madagascar, le requin tigre a été associé à au moins un cas d'intoxication alimentaire rapportés dans la littérature et le requin bouledogue à deux cas. L'analyse génétique du requin impliqué dans l'intoxication alimentaire survenue en novembre 2013 a permis de conclure qu'il s'agissait d'un requin bouledogue.

Les symptômes observés lors de ces intoxications alimentaires associées à la consommation de requins correspondent aux symptômes caractéristiques des ciguatoxines, une famille de toxines produites par une micro-algue du genre *Gambierdiscus*. Toutefois, certains auteurs suggèrent qu'il s'agirait en fait d'autres toxines ayant des propriétés similaires, dénommées carchatoxines, mais dont la structure n'a pas été caractérisée à ce jour. Plus de 175 symptômes différents ont été recensés en phase aiguë et chronique de la ciguatera (nom donné à l'intoxication par les ciguatoxines). Des différences régionales ont été notées et peuvent être attribuées à la présence de ciguatoxines différentes. Ainsi, on distingue les ciguatoxines du Pacifique, des Caraïbes et de l'océan Indien. Il n'est pas exclu que les carchatoxines puissent être de nouveaux analogues de ciguatoxines, par exemple des formes très oxydées.

D'autres données concernant la contamination de requins (chair ou foie), en particulier des requins tigre et bouledogue, par des ciguatoxines (ou des toxines similaires) ont été collectées et analysées dans le rapport du GT. Il s'agit d'études réalisées dans les années 1960 à 1980, à l'aide du bio-essai sur mangouste.

→ *Sur la base de ces éléments, le CES ERCA estime qu'il convient de prendre en compte non seulement les ciguatoxines mais aussi un autre type de toxines, spécifiques de certains requins, et dénommées jusqu'à présent carchatoxines.*

■ **Question 2 concernant les méthodes analytiques**

Les méthodes analytiques applicables à la détection et à la quantification de ciguatoxines dans la chair de requins ont été recensées et décrites dans le rapport du groupe de travail. Ces méthodes comprennent : les essais sur animaux en particulier le bio-essai sur souris, le test sur cellules de neuroblastomes (Neuro-2a), le test radioligand-récepteur (RBA), les tests immunologiques et les méthodes physico-chimiques, notamment la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).

→ *Après avoir considéré les points forts et les faiblesses des méthodes analytiques disponibles au regard de la complexité et de la diversité des toxines qui composent la famille des ciguatoxines (ciguatoxines du Pacifique, des Caraïbes et de l'océan Indien), le CES ERCA recommande d'employer une combinaison des techniques suivantes :*

- *un bio-essai sur souris, afin de rechercher s'il y a une toxicité globale dans l'échantillon ;*
- *un test de cytotoxicité sur cellules Neuro-2a et/ou un test sur récepteur, lesquels présentent une meilleure spécificité et une plus grande sensibilité que le bio-essai sur souris ;*
- *une analyse par LC-MS/MS, afin de tenter de confirmer la présence de ciguatoxines connues en cas de résultats positifs par l'une des méthodes ci-dessus.*

Les données ainsi produites pourraient ensuite être exploitées dans le cadre d'une évaluation des risques sanitaires pour le consommateur.

▶ **Concernant les requins tigre et bouledogue prélevés à La Réunion en 2012 et 2013**

Les résultats d'analyses de 24 échantillons de chair de requins pour la recherche de ciguatoxines par bio-essai sur souris ont été transmis à l'Anses dans le cadre de la saisine par la DGAL. Tous ont produit un résultat négatif. Toutefois, ce test n'est pas suffisamment sensible pour détecter des concentrations de ciguatoxines considérées sans risque pour l'Homme.

Considérant les recommandations précédentes sur les méthodes analytiques, le CES ERCA estime que la seule analyse par bio-essai sur souris ne permet pas de produire des résultats suffisants pour conclure à la salubrité des 24 spécimens de requins quant à la présence de ciguatoxines.

L'Anses a donc engagé une convention de recherche et de développement (CRD) avec l'Arvam (Agence pour la recherche et la valorisation marines, La Réunion), en collaboration avec l'IRTA (Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentaria, Espagne) afin que ces échantillons soient analysés par test de cytotoxicité sur cellules Neuro-2a. Le rapport final a été transmis à l'Anses le 21 juillet 2014.

Les résultats n'ont pas montré la présence de toxines de type ciguatoxines au-delà de la limite de détection de $0,04 \mu\text{g eq P-CTX-1 kg}^{-1}$ de chair. Il convient de noter que cette limite de détection est supérieure à la concentration considérée sans risque pour l'Homme de $0,01 \mu\text{g eq. P-CTX-1 kg}^{-1}$ de chair de poisson.

La CRD incluait également des échantillons du requin bouledogue impliqué dans un foyer d'intoxications survenu à Madagascar en novembre 2013 (124 personnes intoxiquées dont 9 sont décédées) afin qu'ils soient analysés par bio-essai sur souris et par test de cytotoxicité sur cellules Neuro-2a. L'échantillon de chair a donné un résultat positif par bio-essai sur souris, avec des symptômes typiques de ceux connus pour les carchatoxines (prostration, dyspnée, cyanose, convulsions et mortalité par arrêt respiratoire). L'analyse d'un échantillon de chair, d'un échantillon d'estomac et de trois échantillons d'aileron séché par test de cytotoxicité sur cellules Neuro-2a a conclu à la présence de toxines de type ciguatoxines, dont les concentrations estimées sont les suivantes :

- chair : $0,144 \mu\text{g eq P-CTX-1 kg}^{-1}$ (soit 14 fois la concentration considérée sans risque pour l'Homme) ;
- estomac : $114 \mu\text{g eq P-CTX-1 kg}^{-1}$ (soit 11 400 fois la concentration considérée sans risque pour l'Homme) ;
- aileron séché : $0,145 \mu\text{g eq P-CTX-1 kg}^{-1}$; $0,158 \mu\text{g eq P-CTX-1 kg}^{-1}$; $0,737 \mu\text{g eq P-CTX-1 kg}^{-1}$ (soit 14 à 74 fois la concentration considérée sans risque pour l'Homme).

■ **Question 2 concernant un protocole de prélèvement des requins tigre et bouledogue à La Réunion**

Afin de répondre à cette question, le groupe de travail a collecté des éléments d'éthologie des requins tigre et bouledogue dans les eaux réunionnaises, en s'appuyant plus particulièrement sur les résultats préliminaires obtenus dans le cadre du programme CHARC (Connaissances de l'écologie et de l'Habitat de deux espèces de Requins Côtiers sur la côte Ouest de La Réunion).

Ces requins sont des prédateurs apicaux piscivores capables de se nourrir de différentes espèces. Ils présentent à La Réunion une fidélité restreinte à certains sites mais sont capables de coloniser un éventail très large d'habitats différents et de se déplacer sur de longues distances, notamment jusqu'à Madagascar où des intoxications alimentaires associées à la consommation de requins ont été récemment rapportées (novembre 2013 et février 2014). Il serait donc particulièrement intéressant de savoir si les requins effectuent également des déplacements de Madagascar vers La Réunion. On ne connaît aujourd'hui ni l'origine ni la dynamique de bioaccumulation de ces toxines chez les requins. De plus, les connaissances des traits de vie de ces deux espèces de requins et la dynamique de leurs populations sont très partielles et insuffisantes.

→ *En l'absence d'information sur la taille et la structure des populations de requins tigre et bouledogue dans les eaux réunionnaises et compte tenu des connaissances lacunaires concernant leur comportement alimentaire et leurs déplacements à l'échelle de l'océan Indien, il n'est pas possible d'émettre de recommandations pour un protocole de prélèvement de requins permettant de statuer sur les risques liés à une éventuelle autorisation de ces espèces pour la consommation humaine, au regard du risque ciguatérique.*

■ **Question 3 concernant les risques sanitaires liés au méthylmercure**

Les résultats d'analyses de 5 échantillons de chair de requins pour la recherche de plomb, cadmium et mercure, transmis à l'Anses dans le cadre de la saisine par la DGAL, sont présentés dans le tableau 1. Il apparaît que 4 des 5 échantillons de chair de requins analysés ont une concentration en mercure supérieure (jusqu'à 2,5 fois) à la limite maximale fixée par Règlement (CE) n°1881/2006 de la Commission du 19 décembre 2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires, soit un pourcentage de 80%.

Tableau 1 : Résultats d'analyses de 5 échantillons de chair de requins pour la recherche de plomb, cadmium et mercure (méthode ANSES CIME, en mg/kg de poids frais)

	Plomb	Cadmium	Mercure
n°1 - requin tigre	< 0,040 mg/kg	0,013 mg/kg	1,075 mg/kg
n°2- requin tigre	< 0,040 mg/kg	0,010 mg/kg	0,966 mg/kg
n°3 - requin bouledogue	< 0,04 mg/kg	0,014 mg/kg	1,598 mg/kg
n°4 - requin bouledogue	< 0,04 mg/kg	0,017 mg/kg	2,514 mg/kg
n°5 - requin bouledogue	< 0,04 mg/kg	0,011 mg/kg	1,132 mg/kg
Limite maximale fixée par le règlement (CE) n°1881/2006	0,30 mg/kg	0,05 mg/kg	1 mg/kg

Dans son avis du 17 avril 2009¹, l'Agence faisait état de résultats d'analyses de 9 échantillons de chair de requins (requin commun *Lamna nasus* et requin-hâ *Galeorhinus galeus*) issus d'un plan de contrôles mené en 2007. La concentration moyenne en mercure était de 1,3 mg/kg de poids frais, 44% des échantillons dépassaient la limite maximale de 1 mg/kg de poids frais.

Au regard de ces résultats, l'Agence mettait à jour ses recommandations quant à la consommation des poissons prédateurs pélagiques, en particulier l'espadon, à La Réunion vis-à-vis du risque sanitaire lié au méthylmercure (avis du 6 juillet 2006²) pour que les requins soient inclus dans la liste des espèces de poissons à éviter pour les femmes enceintes ou allaitant ainsi que les enfants en bas âge (< 30 mois).

➔ *Les résultats d'analyses de 5 échantillons de chair de requins réalisées en 2013 ne sont pas de nature à modifier les recommandations de l'Agence.*

■ **Conclusions du CES**

L'analyse de 24 échantillons de chair de requins tigre ou bouledogue prélevés à La Réunion en 2012 et 2013 par bio-essai sur souris et par test de cytotoxicité sur cellules Neuro-2a n'a pas montré la présence de toxines de type ciguatoxines au-delà de la limite de détection. Toutefois, il convient de noter que pour ces deux tests la limite de détection est supérieure à la concentration considérée sans risque pour l'Homme de 0,01 µg eq. P-CTX-1 kg⁻¹ de chair de poisson.

L'analyse d'un échantillon de chair du requin bouledogue impliqué dans un foyer d'intoxications survenu à Madagascar en novembre 2013 (124 personnes intoxiquées dont 9 sont décédées) a donné un résultat positif par bio-essai sur souris avec des symptômes typiques de ceux connus pour les carchatoxines. L'analyse d'un échantillon de chair, d'un échantillon d'estomac et de trois échantillons d'aileron séché par test de cytotoxicité sur cellules Neuro-2a a conclu à la présence

¹ Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments du 17 avril 2009 relatif à l'interprétation des résultats d'analyses du plan de surveillance des contaminants chimiques 2007, notamment la recherche de mercure dans les lamproies et les différentes espèces de Sélaciens (saisine n°2008-SA-0309).

² Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments du 6 juillet 2006 relatif à la consommation des poissons prédateurs pélagiques, en particulier l'espadon, à La Réunion vis-à-vis du risque sanitaire lié au méthylmercure (saisine n°206-SA-0003).

de toxines de type ciguatoxines, avec des concentrations estimées à 0,144 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ dans la chair, 114 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ dans l'estomac et 0,145 µg à 0,737 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ dans l'aileron. Ces concentrations sont 14 à 11 400 fois supérieures à la concentration considérée sans risque pour l'Homme.

Par ailleurs, les résultats préliminaires du programme CHARC ont montré que les populations de requins tigre et bouledogue ne sont pas inféodées aux eaux réunionnaises et qu'un des spécimens étudiés (requin tigre) marqué à La Réunion a été capable de se déplacer jusqu'à Madagascar.

En conséquence, le CES ERCA estime que les données produites par l'analyse d'échantillons de chair de 24 spécimens de requins réunionnais et d'échantillons d'un spécimen de requin malgache ne permettent pas d'exclure le risque que les requins pêchés à La Réunion puissent être contaminés par des ciguatoxines (ou des toxines similaires) à des concentrations qui pourraient présenter un risque pour la santé du consommateur.

D'autre part, les analyses de mercure réalisées dans 5 échantillons de chair de requins tigre ou bouledogue ont montré que dans 80% des cas, la concentration était supérieure à la limite maximale fixée pour le règlement (CE) n°1881/2006. Le CES ERCA maintient donc la recommandation émise par l'Agence en 2009 à l'intention des femmes enceintes ou allaitant ainsi que des enfants en bas âge (< 30 mois) d'éviter, à titre de précaution, la consommation de requins, tout comme celle d'espadons, de marlins, de sikis et de lamproies.

Enfin, le CES ERCA soutient les besoins de recherche identifiés par le groupe de travail (voir le rapport pour plus de détails) portant sur :

- ▶ la mise au point d'outils de diagnostic de la présence de ciguatoxines (ou de toxines similaires, telles que les carchatoxines) dans les requins et d'un plan d'action en cas d'intoxication par consommation de requins ;
- ▶ l'identification des analogues de ciguatoxines ou de toxines similaires (carchatoxines) dans les requins de l'océan Indien ;
- ▶ la toxicité de ces toxines, leur origine et leur transfert chez les requins ;
- ▶ la taille et la structure des populations de requins de l'océan Indien ainsi que leurs déplacements et les distances parcourues.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail adopte les conclusions du Comité d'experts spécialisé « Evaluation des risques physico-chimiques dans les aliments ».

L'Agence estime qu'il n'est pas possible d'exclure le risque que les requins tigre et bouledogue pêchés à La Réunion puissent être contaminés par des ciguatoxines (ou des toxines similaires), en particulier suite aux analyses réalisées sur des échantillons du requin bouledogue impliqué dans un récent foyer d'intoxications (avec des cas mortels) survenu à Madagascar et compte tenu des déplacements de ces espèces de requins entre ces deux îles.

Par ailleurs, l'Agence rappelle que la consommation de requins, tout comme celle d'espadons, de marlins, de sikis et de lamproies est à éviter, à titre de précaution, pour la population sensible des femmes enceintes ou allaitant ainsi que des enfants en bas âge (< 30 mois) du fait de leur teneur en mercure.

Marc Mortureux

MOTS-CLES

Ciguatoxines, Requins, Ile de La Réunion, Méthylmercure

ANNEXES

Rapport d'expertise collective du groupe de travail « ciguatoxines », Etat des connaissances relatives à la contamination des requins, notamment tigre et bouledogue, par des ciguatoxines : occurrence, méthodes analytiques, cas humains rapportés et éléments d'éthologie pour ces deux espèces de requins, novembre 2014, 84pp.

Suivi de l'actualisation des versions précédentes de l'avis de l'Anses datées du 6 août 2014 et du 9 juillet 2014.

Suivi de l'actualisation de l'avis de l'Anses

Date	Version	Page	Description de la modification (<i>en bleu, italique</i>)
24/11/2014	03	04	<p>Texte du 6 août 2014</p> <p>L'analyse d'un échantillon de chair, d'un échantillon d'œsophage et de trois échantillons d'aileron séché par test de cytotoxicité sur cellules Neuro-2a a conclu à la présence de toxines de type ciguatoxines, dont les concentrations estimées sont les suivantes :</p> <ul style="list-style-type: none"> - chair : 0,144 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ (soit 14 fois la concentration considérée sans risque pour l'Homme) ; - œsophage : 114 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ (soit 11 400 fois la concentration considérée sans risque pour l'Homme) ; - aileron séché : 0,145 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ ; 0,158 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ ; 0,737 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ (soit 14 à 74 fois la concentration considérée sans risque pour l'Homme). <p>Texte révisé</p> <p>L'analyse d'un échantillon de chair, d'un échantillon d'<i>estomac</i> et de trois échantillons d'aileron séché par test de cytotoxicité sur cellules Neuro-2a a conclu à la présence de toxines de type ciguatoxines, dont les concentrations estimées sont les suivantes :</p> <ul style="list-style-type: none"> - chair : 0,144 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ (soit 14 fois la concentration considérée sans risque pour l'Homme) ; - <i>estomac</i> : 114 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ (soit 11 400 fois la concentration considérée sans risque pour l'Homme) ; - aileron séché : 0,145 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ ; 0,158 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ ; 0,737 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ (soit 14 à 74 fois la concentration considérée sans risque pour l'Homme).
24/11/2014	03	05	<p>Texte du 6 août 2014</p> <p>L'analyse d'un échantillon de chair, d'un échantillon d'œsophage et de trois échantillons d'aileron séché par test de cytotoxicité sur cellules Neuro-2a a conclu à la présence de toxines de type ciguatoxines, avec des concentrations estimées à 0,144 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ dans la chair, 114 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ dans l'œsophage et 0,145 µg à 0,737 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ dans l'aileron. Ces concentrations sont 14 à 11 400 fois supérieures à la concentration considérée sans risque pour l'Homme.</p> <p>Texte révisé</p> <p>L'analyse d'un échantillon de chair, d'un échantillon d'<i>estomac</i> et de trois échantillons d'aileron séché par test de cytotoxicité sur cellules Neuro-2a a conclu à la présence de toxines de type ciguatoxines, avec des concentrations estimées à 0,144 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ dans la chair, 114 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ dans l'<i>estomac</i> et 0,145 µg à 0,737 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ dans l'aileron. Ces concentrations sont 14 à 11 400 fois supérieures à la concentration considérée sans risque pour l'Homme.</p>
25/07/2014	02	02	<p>Texte du 9 juillet 2014</p> <p>L'ensemble des travaux a été adopté par le CES ERCA en réunion plénière le 26 juin 2014 et par voie télématique le 3 juillet 2014.</p> <p>Texte révisé</p> <p>L'ensemble des travaux a été adopté par le CES ERCA en réunion plénière le 26 juin 2014 et par voie télématique le 3 juillet 2014. <i>Une mise à jour des travaux a été adoptée par le président du CES ERCA par voie télématique le 25 juillet 2014, suite à la réception d'informations complémentaires le 21 juillet 2014.</i></p>

25/07/2014	02	03	<p><u>Texte du 9 juillet 2014</u></p> <p>Les résultats d'analyses de 24 échantillons de chair de requins pour la recherche de ciguatoxines par bio-essai sur souris ont été transmis à l'Anses dans le cadre de la saisine par la DGAL. Tous ont produit un résultat négatif.</p> <p><u>Texte révisé</u></p> <p>Les résultats d'analyses de 24 échantillons de chair de requins pour la recherche de ciguatoxines par bio-essai sur souris ont été transmis à l'Anses dans le cadre de la saisine par la DGAL. Tous ont produit un résultat négatif. <i>Toutefois, ce test n'est pas suffisamment sensible pour détecter des concentrations de ciguatoxines considérées sans risque pour l'Homme.</i></p>
25/07/2014	02	04	<p><u>Texte du 9 juillet 2014</u></p> <p>Les résultats préliminaires obtenus sur les 24 échantillons de chair de requins réunionnais n'ont pas révélé de toxicité dans ce test aux doses testées.</p> <p>La CRD incluait également des échantillons du requin bouledogue impliqué dans un foyer d'intoxications survenu à Madagascar en novembre 2013 (124 personnes intoxiquées dont 9 sont décédées) afin qu'ils soient analysés par bio-essai sur souris et par test de cytotoxicité sur cellules Neuro-2a. L'échantillon de chair a donné un résultat positif par bio-essai sur souris, les premiers résultats obtenus sur cellules Neuro-2a ne sont pas encore interprétables. Les symptômes observés chez les souris (prostration, dyspnée, cyanose, convulsions et mortalité par arrêt respiratoire) sont typiques de ceux connus pour les carchatoxines. Trois échantillons d'aileron et un d'œsophage ont aussi été testés sur cellules Neuro-2a et les premiers résultats montrent une activité de type ciguatoxines dans ces échantillons, particulièrement puissante dans l'échantillon d'œsophage. Ces résultats préliminaires sont en cours de confirmation.</p> <p><u>Texte révisé</u></p> <p><i>Le rapport final a été transmis à l'Anses le 21 juillet 2014.</i></p> <p><i>Les résultats n'ont pas montré la présence de toxines de type ciguatoxines au-delà de la limite de détection de 0,04 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ de chair. Il convient de noter que cette limite de détection est supérieure à la concentration considérée sans risque pour l'Homme de 0,01 µg eq. P-CTX-1 kg⁻¹ de chair de poisson.</i></p> <p>La CRD incluait également des échantillons du requin bouledogue impliqué dans un foyer d'intoxications survenu à Madagascar en novembre 2013 (124 personnes intoxiquées dont 9 sont décédées) afin qu'ils soient analysés par bio-essai sur souris et par test de cytotoxicité sur cellules Neuro-2a. L'échantillon de chair a donné un résultat positif par bio-essai sur souris, avec des symptômes typiques de ceux connus pour les carchatoxines (prostration, dyspnée, cyanose, convulsions et mortalité par arrêt respiratoire). <i>L'analyse d'un échantillon de chair, d'un échantillon d'œsophage et de trois échantillons d'aileron séché par test de cytotoxicité sur cellules Neuro-2a a conclu à la présence de toxines de type ciguatoxines, dont les concentrations estimées sont les suivantes :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>chair : 0,144 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ (soit 14 fois la limite la concentration considérée sans risque pour l'Homme) ;</i> - <i>œsophage : 114 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ (soit 11 400 fois la concentration considérée sans risque pour l'Homme) ;</i> - <i>aileron séché : 0,145 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ ; 0,158 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ ; 0,737 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ (soit 14 à 74 fois la concentration considérée sans risque pour l'Homme).</i>

25/07/2014	02	05	<p>■ Conclusions du CES</p> <p>Texte du 9 juillet 2014</p> <p>Les résultats préliminaires obtenus par le test de cytotoxicité sur cellules Neuro-2a de 24 échantillons de chair de requins tigre ou bouledogue prélevés à La Réunion en 2012 et 2013 n'ont pas mis en évidence la présence de ciguatoxines à une concentration entraînant une réponse toxique, aux doses testées. Les résultats obtenus par bio-essai sur souris sont négatifs.</p> <p>En revanche, l'analyse d'un échantillon de chair du requin bouledogue impliqué dans un foyer d'intoxications survenu à Madagascar en novembre 2013 (124 personnes intoxiquées dont 9 sont décédées) a donné un résultat positif par bio-essai sur souris avec des symptômes typiques de ceux connus pour les carchatoxines. Trois échantillons d'aileron et un d'œsophage ont aussi été testés sur cellules Neuro-2a et les premiers résultats montrent une activité de type ciguatoxines dans ces échantillons, particulièrement puissante dans l'échantillon d'œsophage. Ces résultats préliminaires sont en cours de confirmation.</p> <p>Les résultats préliminaires du programme CHARC ayant montré que les populations de requins tigre et bouledogue n'étaient pas inféodées aux eaux réunionnaises et qu'un des spécimens étudiés (requin tigre) avait été capable de se déplacer jusqu'à Madagascar, le CES ERCA estime que les données produites par l'analyse de 24 échantillons de requins ne permettent pas d'exclure le risque que les requins pêchés à La Réunion puissent être contaminés par des ciguatoxines (ou des toxines similaires) à des concentrations qui pourraient présenter un risque pour la santé du consommateur.</p> <p>Texte révisé</p> <p><i>L'analyse de 24 échantillons de chair de requins tigre ou bouledogue prélevés à La Réunion en 2012 et 2013 par bio-essai sur souris et par test de cytotoxicité sur cellules Neuro-2a n'a pas montré pas la présence de toxines de type ciguatoxines au-delà de la limite de détection. Toutefois, il convient de noter que pour ces deux tests la limite de détection est supérieure à la concentration considérée sans risque pour l'Homme de 0,01 µg eq. P-CTX-1 kg⁻¹ de chair de poisson.</i></p> <p><i>L'analyse d'un échantillon de chair du requin bouledogue impliqué dans un foyer d'intoxications survenu à Madagascar en novembre 2013 (124 personnes intoxiquées dont 9 sont décédées) a donné un résultat positif par bio-essai sur souris avec des symptômes typiques de ceux connus pour les carchatoxines. L'analyse d'un échantillon de chair, d'un échantillon d'œsophage et de trois échantillons d'aileron séché par test de cytotoxicité sur cellules Neuro-2a a conclu à la présence de toxines de type ciguatoxines, avec des concentrations estimées à 0,144 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ dans la chair, 114 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ dans l'œsophage et 0,145 µg à 0,737 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ dans l'aileron. Ces concentrations sont 14 à 11 400 fois supérieures à la concentration considérée sans risque pour l'Homme.</i></p> <p><i>Par ailleurs, les résultats préliminaires du programme CHARC ont montré que les populations de requins tigre et bouledogue ne sont pas inféodées aux eaux réunionnaises et qu'un des spécimens étudiés (requin tigre) marqué à La Réunion a été capable de se déplacer jusqu'à Madagascar.</i></p> <p><i>En conséquence, le CES ERCA estime que les données produites par l'analyse d'échantillons de chair de 24 spécimens de requins réunionnais et d'échantillons d'un spécimen de requin malgache ne permettent pas d'exclure le risque que les requins pêchés à La Réunion puissent être contaminés par des ciguatoxines (ou des toxines similaires) à des concentrations qui pourraient présenter un risque pour la santé du consommateur.</i></p>
------------	----	----	--

Etat des connaissances relatives à la contamination des requins, notamment tigre et bouledogue, par des ciguatoxines : occurrence, méthodes analytiques, cas humains rapportés et éléments d'éthologie pour ces deux espèces de requins

Saisine 2013-SA-0198 « Demande d'avis relatif à l'évaluation du risque lié à la consommation de deux espèces de requins à La Réunion, notamment vis-à-vis du risque lié aux ciguatoxines »

RAPPORT d'expertise collective**

**Comité d'experts spécialisé
« Evaluation des risques physico-chimiques dans les aliments »**

**Groupe de travail
« ciguatoxines »**

Novembre 2014

**** rapport révisé qui annule et remplace les versions précédentes datées du 26 juin 2014 et du 25 juillet 2014.**

Mots clés

Ciguatoxines, requins, Ile de La Réunion

Présentation des intervenants

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

GROUPE DE TRAVAIL

Président

M. VERNOUX Jean-Paul – Université de Caen – Connaissances sur les ciguatoxines, aspects écologiques, toxicologiques et méthodes analytiques, membre du CES ERCA

Membres

Mme CHINAIN Mireille – Institut Louis Malardé (Polynésie française) – Connaissances sur les ciguatoxines, aspects écologiques, toxicologiques et méthodes analytiques

M. DIOGENE Jorge – IRTA (Espagne), Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentaria – Connaissances sur les ciguatoxines, aspects écologiques, toxicologiques et méthodes analytiques

M. FREMY Jean-Marc – retraité de l'Anses – Connaissances sur les ciguatoxines, aspects écologiques, toxicologiques et méthodes analytiques

M. HESS Philipp – Ifremer (Nantes), Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer – Méthodes analytiques pour les ciguatoxines

M. SORIA Marc – IRD (La Réunion), Institut de Recherche pour le Développement – Ethologie des requins dans les eaux réunionnaises

Mme TROTTEREAU Sophie – Anses / Laboratoire de sécurité des aliments (Maisons-Alfort) – Méthodes analytiques pour les ciguatoxines (LNR biotoxines marines)

M. TURQUET Jean – ARVAM (La Réunion), Agence pour la recherche et la valorisation marines – Connaissances sur les ciguatoxines, aspects écologiques, toxicologiques et méthodes analytiques

COMITÉ D'EXPERTS SPÉCIALISÉ

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

- CES ERCA « Evaluation des risques physico-chimiques dans les aliments » – en réunions plénières du 19 novembre 2013, 17 mars 2014, 14 avril 2014, 26 juin 2014 et par voie télématique le 3 juillet 2014. Une mise à jour des travaux a été adoptée par le président du CES ERCA par voie télématique le 25 juillet 2014, suite à la réception d'informations complémentaires le 21 juillet 2014.

Président

M. BADOT Pierre-Marie – Université Franche-Comté, CNRS – Professeur des universités – contaminants, environnement, écotoxicologie

Membres

M. ATGIE Claude – Institut polytechnique de Bordeaux – Professeur des universités - enseignant chercheur – toxicologie alimentaire

Mme BLANCHEMANCHE Sandrine – INRA – Directrice d'unité – sociologie

Mme CAMEL Valérie – AgroParisTech – Professeur, enseignant chercheur – chimie analytique, contaminants organiques

Mme CLAUW Martine – ENVT – Professeur – toxicologie expérimentale

Mme DUMAT Camille – ENSAT-INPT-ECOLAB – PR INP, enseignante chercheur – contamination des sols, métaux

M. FEIDT Cyril – ENSAIA – Professeur des universités – transferts chaînes trophiques et animaux terrestres

M. GROB Konrad – Laboratoire Cantonal de Zurich (Official Food Control Authority of the Canton of Zurich) – chef de service – chimie analytique, MCDA

Mme HAGEN-PICARD Nicole – ENVT – Enseignant chercheur – toxicocinétique

M. LAMBRE Claude – DGS/INSERM – Directeur de recherche – toxicologie alimentaire

M. LARROQUE Michel – Université de Montpellier 1 – Professeur des universités - Directeur du département – chimie analytique

M. LE BIZEC Bruno – ONIRIS – Professeur Dr HDR en sécurité des aliments, Directeur – chimie analytique, contaminants organiques

M. MAIXENT Jean-Michel – Université de Poitiers – Professeur des universités – toxicologie alimentaire

M. MAXIMILIEN Rémi – CEA – Médecin toxicologue, Directeur de recherche – toxicologie alimentaire

M. NARBONNE Jean-François – retraité de l'Université Bordeaux – Professeur de toxicologie – toxicologie alimentaire

M. NESSLANY Fabrice – Institut Pasteur Lille – Chef du service de toxicologie – génotoxicité

M. RENAUDIN Jean-Marie – Centre hospitalier Emile Durkheim – Médecin PH en allergologie – allergies alimentaires

M. ROUDOT Alain-Claude – Université de Bretagne occidentale – Professeur des universités, enseignant chercheur – statistiques et modélisation

Mme TACK Karine – INERIS – Ingénieur de recherche – chimie analytique

Mme VASSEUR Paule – Université de Metz – Professeur de Toxicologie, émérite – toxicologie environnementale

M. VERNOUX Jean-Paul – Université de Caen – Professeur de Toxicologie, Directeur d'école d'ingénieurs – toxicologie alimentaire, milieux marins

PARTICIPATION ANSES

Coordination et contribution scientifique

Mme ARNICH Nathalie – chef de projets scientifiques – Département « Evaluation des risques chimiques dans les aliments », Anses

Secrétariat administratif

Mme LAURENT Angélique – Anses

SOMMAIRE

Présentation des intervenants	3
Sigles et abréviations	7
Liste des tableaux.....	7
Liste des figures	7
1 Contexte, objet et modalités de traitement de la saisine.....	8
1.1 Contexte.....	8
1.2 Objet de la saisine.....	8
1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation.....	9
1.4 Prévention des risques de conflits d'intérêts.	9
2 Eléments de réponse à la Question 1.....	10
2.1 Toxicité des ciguatoxines et mode d'action.....	10
2.2 Le carchatoxisme, intoxication par les requins	12
2.3 Autres données de contamination des requins par des ciguatoxines (ou par des toxines ayant des propriétés similaires)	16
3 Eléments de réponse à la Question 2.....	18
3.1 Introduction	18
3.2 Chimie des ciguatoxines	18
3.3 Les essais sur animaux	22
3.3.1 Principe général du bio-essai sur souris.....	22
3.3.2 Bilan des protocoles du bio-essai sur souris décrits.....	23
3.3.3 Avantages et inconvénients du bio-essai sur souris.....	25
3.3.4 Application des essais sur animaux aux échantillons de requins.....	25
3.4 Le test cellulaire Neuro-2a.....	25
3.4.1 Principe	25
3.4.2 Avantages et inconvénients du test cellulaire Neuro-2a.....	26
3.4.3 Perspectives d'application du test Neuro-2a à des échantillons de requins	26
3.5 Le test Radioligand-Récepteur ou « Radioligand Binding Assay » (RBA).....	27
3.5.1 Principe	27
3.5.2 Avantages et inconvénients du RBA	27
3.5.3 Perspectives d'application du RBA à des échantillons de requins	28
3.6 Les tests immunologiques	28
3.6.1 Principe	28
3.6.2 Avantages et inconvénients des tests immunologiques	28
3.6.3 Perspectives d'application des tests immunologiques à des échantillons de requins	29
3.7 Méthodes physico-chimiques	29
3.7.1 Etat de l'art.....	29
3.7.2 Avantages et inconvénients des méthodes physico-chimiques	31
3.7.3 Perspectives d'application des méthodes physico-chimiques à des échantillons de requins.....	31

3.8 Comparaison des méthodes et proposition d'une stratégie analytique	31
3.8.1 Données actuelles en matière d'évaluation des risques notamment des concentrations considérées sans risque pour l'Homme.....	31
3.8.2 Comparaison des méthodes décrites	32
3.8.2.1 Points communs.....	32
3.8.2.2 Points spécifiques aux différentes méthodes	33
3.8.3 Perspectives et proposition de stratégie analytique	34
3.9 Commentaires du GT concernant les résultats d'analyse de requins tigre et bouledogue prélevés à La Réunion en 2012 et 2013	35
3.10 Eléments d'éthologie des requins tigre et bouledogue dans les eaux réunionnaises	37
3.10.1 Le requin tigre <i>Galeocerdo cuvier</i>	37
3.10.2 Le requin bouledogue <i>Carcharhinus leucas</i>	38
3.10.3 Synthèse et perspectives	40
4 Perspectives – besoins de recherche	42
5 Conclusions du groupe de travail	44
6 Bibliographie	47
6.1 Publications.....	47
6.2 Normes.....	56
6.3 Législation et réglementation.....	56
ANNEXES	57
Annexe 1 : Lettre de saisine.....	58
Annexe 2 : Arrêté préfectoral n°3621/2009/SG/DRCTCV du 24 décembre 2009 réglementant la commercialisation de certaines espèces de poissons marins tropicaux, Préfecture de La Réunion.	60
Annexe 3 : Description détaillée de différentes variantes du bio-essai sur souris	65
Annexe 4 : Description détaillée du protocole pour le test Neuro-2a	70
Annexe 5 : Description détaillée du protocole pour le test RBA	72
Annexe 6 : Description détaillée des diverses possibilités de tests immunologiques	76
Annexe 7 : Suivi de l'actualisation du rapport.....	80

Sigles et abréviations

Anses : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
 BES : bio-essai sur souris
 CTXs : ciguatoxines
 C-CTXs : ciguatoxines des Caraïbes
 CSDP : canaux sodium dépendant du potentiel
 DGAL : Direction générale de l'Alimentation
 DL₅₀ : dose létale à 50%
 EFSA : Autorité européenne de sécurité des aliments (*European Food Safety Authority*)
 I-CTXs : ciguatoxines de l'océan Indien
 i.p. : intrapéritonéal
 LC-MS/MS : chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem, (Liquid chromatography-mass spectrometry ou LC-MS)
 Neuro-2a/test cellulaire Neuro-2a : test cellulaire sur cellules de neuroblastome murin
 LNR : laboratoire national de référence
 PbTx_s : brevétotoxines
 p.c. : poids corporel
 P-CTXs : ciguatoxines du Pacifique
 RBA : test Radioligand-Récepteur ou « *Radioligand Binding Assay* »
 TIAC : toxi-infection alimentaire collective

Liste des tableaux

Tableau 1. Liste de requins dits « ciguatériques » identifiés par Bagnis (1981)	13
Tableau 2. Quelques résultats d'analyse par bio-essai sur souris de requins impliqués dans des intoxications alimentaires à Madagascar	14
Tableau 3 : Diagnostic différentiel des intoxications par consommation de requins et de poissons de récif	16
Tableau 4. Etat des connaissances sur la diversité des ciguatoxines isolées à partir de poissons ou de microalgues	21
Tableau 5. Synthèse de différentes variantes du bio-essai sur souris	24
Tableau 6. Résultats des analyses de bio-essais sur souris pour la détection de ciguatoxines dans la chair de 24 spécimens de requins prélevés à La Réunion en 2012 et 2013	35

Liste des figures

Figure 1. Chronologie d'apparition des 3 grands types de symptômes observés au cours d'une intoxication ciguatérique	11
Figure 2 : Carte présentant la localisation des districts Fénériver Est et Toamasina II	15
Figure 3. Métabolisation des ciguatoxines algales par les poissons dans l'océan Pacifique	19
Figure 4. Comparaison des structures de CTXs en provenance de l'océan Pacifique (P-CTXs) avec celles des Caraïbes (C-CTXs)	20
Figure 5. Profils d'éluion des CTXs de l'océan Indien (I-CTX) et des Caraïbes (C-CTX-1)	20
Figure 6. Carchatoxines A et B éluant à un temps différent de la P-CTX-1 en chromatographie en phase reverse	22
Figure 7. Séparation et limites de quantification des récentes méthodes LC-MS/MS pour les CTXs du Pacifique et des Caraïbes	30
Figure 8 : Trajectoire estimée d'un requin bouledogue mâle entre le 15 mars et le 6 septembre à partir des mesures d'éclaircissement obtenues par le capteur de la marque miniPAT fixée sur l'aile du requin	39

1 Contexte, objet et modalités de traitement de la saisine

Le contenu de la saisine est rapporté en annexe 1.

1.1 Contexte

Le département de La Réunion dispose depuis 1966 d'une réglementation spécifique (par arrêté préfectoral) qui restreint ou interdit la commercialisation de certaines espèces de poissons en raison du risque d'intoxication par des biotoxines marines, en particulier des ciguatoxines. Parmi ces espèces de poissons figurent depuis 1999 la plupart des espèces de requins, notamment celles de la famille des *Carcharhinidae* (annexe 2).

Le Préfet de La Réunion a sollicité la Direction générale de l'Alimentation (DGAL) afin que soit réévalué le risque lié à deux espèces de requins aujourd'hui interdites à la consommation par cet arrêté préfectoral. Il s'agit du requin tigre (*Galeocerdo cuvier*) et du requin bouledogue (*Carcharhinus leucas*).

Afin d'acquiescer des données de contamination de ces deux espèces de requins par les ciguatoxines, les services de la préfecture de La Réunion ont lancé une campagne de prélèvements en 2012 portant sur 12 spécimens par espèce avec recherche de ciguatoxines par bio-essai sur souris. Cette campagne de prélèvements a été étendue en 2013 avec un objectif de 45 spécimens par espèce. A ce jour, 24 spécimens ont fait l'objet d'analyses de ciguatoxines par bio-essai sur souris et 5 d'entre eux ont également fait l'objet d'analyses de métaux lourds (plomb, cadmium, mercure).

1.2 Objet de la saisine

Dans ce contexte, il est demandé à l'Anses de répondre aux questions suivantes :

Question 1 : Quelles sont les connaissances actuelles quant à la contamination par des ciguatoxines de la chair de requins, en particulier les requins tigre et bouledogue? Des cas d'intoxications alimentaires associés à la consommation de requins ont-ils déjà été rapportés?

Question 2 : Quelles sont les méthodes analytiques actuellement applicables à la détection et à la quantification des ciguatoxines dans la chair de requins? Les résultats issus de ces méthodes peuvent-ils être utilisés pour mener une évaluation des risques sanitaires liés à une éventuelle autorisation de ces espèces pour la consommation humaine dans cette zone?

Dans le cas où l'Anses identifierait une méthode d'analyse des ciguatoxines dans la chair de requins suffisamment fiable, quelles données seraient nécessaires pour mener cette évaluation et quelles recommandations pourraient être émises concernant le protocole de prélèvement du requin tigre et du requin bouledogue à La Réunion? Il sera notamment pris en compte la zone géographique concernée et l'éthologie de ces deux espèces de requins en termes de capacité de déplacements dans les eaux marines réunionnaises.

Question 3 : En 2006 et 2009, l'Agence a rendu des avis relatifs à la consommation des poissons prédateurs pélagiques à La Réunion vis-à-vis du risque sanitaire lié au méthylmercure. Les nouvelles analyses réalisées en 2013 sur des spécimens de requins sont-elles de nature à réviser les conclusions de ces avis?

1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

L'Anses a confié l'instruction de cette saisine au groupe de travail « ciguatoxines », rattaché au Comité d'Experts Spécialisé « Evaluation des risques physico-chimiques dans les aliments » (CES ERCA), pour les questions 1 et 2 ayant trait aux ciguatoxines. Concernant la question 3, relative aux travaux antérieurs de l'Anses sur les risques sanitaires liés au méthylmercure, un travail initialement réalisé en interne à l'Anses a été présenté au CES ERCA. Ces derniers éléments de réponse ne figurent donc pas dans le présent rapport, mais dans la note « Expertise collective : synthèse de l'argumentaire et conclusions » du CES ERCA, qui a ensuite été reprise dans l'avis rendu par l'Anses.

Les travaux d'expertise du groupe de travail ont été régulièrement soumis au CES (tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques). Le rapport produit par le groupe de travail tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES.

Ces travaux sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires.

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

1.4 Prévention des risques de conflits d'intérêts.

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 rendues publiques *via* le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

2 Eléments de réponse à la Question 1

Rappel de la Question 1 : Quelles sont les connaissances actuelles quant à la contamination par des ciguatoxines de la chair de requins, en particulier les requins tigre et bouledogue? Des cas d'intoxications alimentaires associés à la consommation de requins ont-ils déjà été rapportés?

2.1 Toxicité des ciguatoxines et mode d'action

En introduction aux éléments de réponse à la question 1, un bref rappel de la toxicité des ciguatoxines (CTXs) et de leur mode d'action est proposé. Une revue détaillée peut être trouvée dans divers articles ou rapports, aussi bien en anglais (EFSA, 2010), qu'en français (Bulletin épidémiologique n°56 de mars 2013 ; Bulletin de veille sanitaire Cire Antilles Guyane n°3 d'avril 2013), dont les éléments présentés ci-après sont issus.

L'intoxication liée à la consommation de poissons contaminés par des ciguatoxines porte le nom de ciguatera. Le producteur¹ de ces toxines est une micro-algue proliférant épisodiquement sur les substrats coralliens dégradés du genre *Gambierdiscus*, un dinoflagellé benthique épiphyte. Les poissons herbivores ou microphages ingèrent cette micro-algue puis les toxines sont véhiculées le long de la chaîne trophique, jusqu'aux grands prédateurs piscivores tels que les carangues, les barracudas, les murènes et les requins. Le niveau de contamination dépend alors de l'histoire alimentaire de chaque poisson, de son niveau trophique, de la zone géographique concernée, et du résultat des cinétiques d'accumulation/métabolisation/excrétion des toxines ingérées.

Le syndrome clinique associe des symptômes gastro-intestinaux (nausées, vomissements, douleurs abdominales, diarrhées), neurologiques impliquant des troubles de la sensibilité (hyperesthésie, paresthésie, dysesthésie), musculaires, articulaires, cutanées (prurit, d'où l'appellation de « gratte » dans certaines régions), cardiovasculaires (bradycardie, hypotension), d'intensité variable et apparaissant 30 minutes à 48h après ingestion. Plus de 175 symptômes différents ont été recensés en phase aiguë et chronique de la maladie. Les symptômes gastro-intestinaux disparaissent généralement en 1 à 4 jours sans traitement particulier mais certains symptômes, principalement neurologiques, peuvent perdurer pendant plusieurs semaines, voire plusieurs mois.

Des différences régionales ont été notées dans le syndrome clinique et peuvent être attribuées à la présence de ciguatoxines différentes. Une grande variabilité des symptômes entre individus a également été constatée.

Chez l'homme, selon Lehane (1999, tel que décrit dans l'avis de l'EFSA de 2010 en fin de paragraphe 10), la dose minimale susceptible de provoquer des symptômes chez 20% des consommateurs serait de 1 ng kg⁻¹ p.c., en se basant sur une contamination de 0,1 µg P-CTX-1 kg⁻¹ de poisson, une consommation de poisson de 500 g et un individu de 50 kg p.c.

Les cibles moléculaires privilégiées des CTXs sont les canaux sodiques dépendant du potentiel (CSDP) qui jouent un rôle fondamental dans la genèse et la propagation de l'influx nerveux. La fixation des CTXs au niveau du site 5 des sous-unités α de ces protéines présentes au niveau de la membrane plasmique des cellules électriquement excitables entraîne l'ouverture prolongée de ces canaux même au potentiel membranaire de repos, ce qui se traduit par un flux entrant continu

¹ Certaines cyanobactéries marines pélagiques (*Hydrocoleum spp.* et *Trichodesmium spp.*) pourraient être une autre source de contamination. Des travaux ont effet mis en évidence la production de toxines de type ciguatoxines dans des prélèvements de populations cyanobactériennes en Nouvelle-Calédonie, en lien avec des cas d'intoxications humaines suite à la consommation de bénitiers et en l'absence de détection de *Gambierdiscus spp.* dans le suivi environnemental de la zone concernée (Laurent et al., 2008 ; Kerbrat et al., 2010).

d'ions Na^+ dans les cellules. Afin de pallier cette augmentation du sodium intracellulaire, des mécanismes cellulaires se mettent alors en place pour permettre la fuite du Na^+ contre une entrée de Ca^{2+} d'où une augmentation du calcium intracellulaire. Cette fixation quasi irréversible des CTXs sur les CSDPs a pour conséquence une altération à la fois de la conduction nerveuse et de la morphologie des cellules nerveuses.

Cet ensemble de modifications induites par les CTXs (phénomènes de dépolarisation et d'hyperexcitabilité, augmentation du Na^+ et du Ca^{2+} intracellulaires, libération anarchique de neurotransmetteurs, gonflement lié à l'afflux d'eau...) explique la diversité des signes cliniques observés dans les cas d'intoxication.

- Au niveau neurologique, la multitude de symptômes tels que les atteintes motrices, sensitives, cérébelleuses, psychiatriques, est une conséquence directe de l'altération des fibres du système nerveux périphérique, central et autonome.
- Au niveau digestif, c'est le niveau élevé de Ca^{2+} intracellulaire qui serait à l'origine d'une augmentation des sécrétions intestinales et donc de la survenue des diarrhées profuses.
- Au niveau musculaire, l'augmentation intracellulaire en Ca^{2+} génère une augmentation de la fréquence et de l'intensité des contractions musculaires, tandis que les décharges de potentiels d'action spontanés et répétitifs induisent, elles, des contractions musculaires désordonnées.
- Au niveau cardiaque, en plus des effets musculaires, l'action des CTXs passe par l'intermédiaire du système nerveux autonome, la bradycardie et l'hypotension étant liées à une hyperstimulation parasympathique (d'où la grande efficacité de l'atropine dans le traitement symptomatique de la ciguatéra) et à un faible tonus sympathique.

La Figure 1 décrit l'apparition des 3 types de symptômes en fonction du temps. A noter que selon les océans concernés, les symptômes dominants sont différents. Ainsi, les symptômes digestifs (en particuliers les vomissements) et cardiaques sont dominants dans les Caraïbes tandis que dans le Pacifique Est, en Australie et dans l'océan Indien ce sont les symptômes neurologiques qui dominent (Pottier et al., 2001).

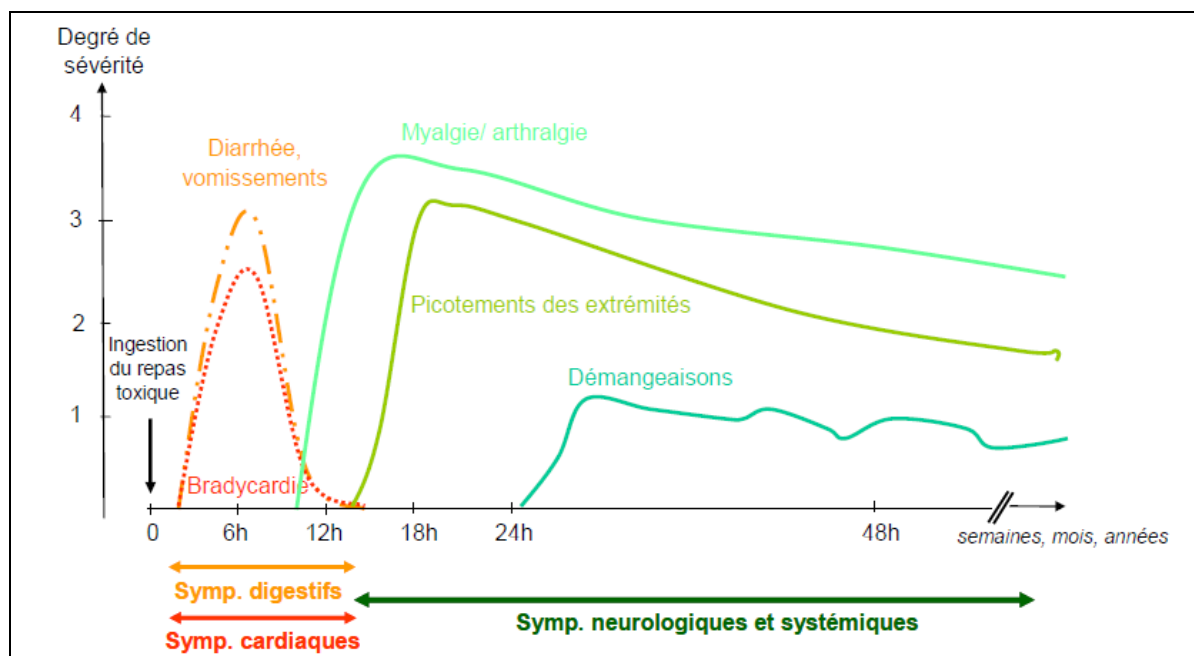


Figure 1. Chronologie d'apparition des 3 grands types de symptômes observés au cours d'une intoxication ciguatérique (Chinain et al., 2013, modifié d'après Lawrence et al., 1980)

Pour ce qui est de l'océan Indien, qui nous intéresse plus particulièrement dans le cadre de cette saisine, la ciguatera a été rapportée historiquement à l'île Maurice (île proche de La Réunion) au XIX^{ème} siècle (Hamilton et al., 2002). L'analyse épidémiologique menée à La Réunion montre qu'au cours des années 1986-1999, 484 cas de ciguatera ont été recensés et 150 cas sur 2000-2010. La ciguatera représente 80% des cas d'intoxication alimentaire par les poissons. Le taux d'incidence annuel est variable et reste faible par rapport à d'autres régions telles que la Polynésie française. Entre 1986 et 1999, ce taux d'incidence a été estimé à 0,8 cas pour 10 000 habitants, et à 0,2 entre 2000 et 2010.

Une réglementation locale spécifique existe depuis 1966, fixant une liste d'espèces de poissons tropicaux interdites à la commercialisation. Cette liste évolue régulièrement en fonction de l'état des connaissances, de la situation épidémiologique locale et régionale, limitant ainsi l'impact néfaste sur la santé. Deux révisions majeures ont été réalisées en 1982 et en 1999, cette dernière introduisant des espèces de requins parmi la liste des espèces interdites (la dernière mise à jour date de 2009 et figure en annexe 2).

Sur le plan clinique, la symptomatologie typiquement observée à La Réunion regroupe des signes neurologiques (paresthésie, dysesthésie, myalgie), digestifs (diarrhée) et généraux (asthénie résiduelle). Le plus évocateur est l'inversion de la sensation chaud/froid ou allodynie (Bagnis et al., 1992 ; Quod et Turquet, 1996). La majeure partie des foyers d'intoxication est due à des poissons pêchés sur les bancs de pêche du Soudan, de Saya de Malha, de Rodrigues ou de l'île Maurice. Seul 10% des cas sont dus à des poissons pêchés sur les côtes réunionnaises.

2.2 Le carchatoxisme, intoxication par les requins

De manière générale, les intoxications par consommation de requins sont peu documentées. Les cas les plus nombreux et les mieux décrits sont récents (années 90) et concernent essentiellement Madagascar. Quelques cas sont néanmoins répertoriés dans d'autres régions du monde.

Halstead (1978) décrit plusieurs cas d'intoxications dont le plus ancien date de 1873 en Nouvelle Calédonie, plusieurs personnes ayant été malades après la consommation de foie d'un requin dont l'espèce n'est pas décrite. Le cas est rapporté sévère avec une personne décédée. En 1964, Cooper rapporte la mort de plusieurs personnes après consommation de foie de requin tigre (*Galeocerdo cuvieri*) dans les îles Gilbert, un archipel situé dans l'océan Pacifique (atolls de Beru en 1957 et de Tabiteuea en 1960 et 1961). Par contre, la chair est décrite comme non toxique.

Plus récemment, dans les îles Cook (océan Pacifique à l'ouest de la Polynésie française), deux cas (symptomatologie non précisée) ont été rapportés après consommation de requin pointe blanche (*Triaenodon obesus*) (Rongo et van Woosik, 2011).

En Polynésie française, deux cas sévères ont été décrits par Gatti et al. (2008). Les personnes intoxiquées ont consommé du foie ou des viscères de requins dont les espèces ne sont pas précisées. Elles ont été hospitalisées avec des symptômes neurologiques et digestifs caractéristiques et similaires aux cas décrits à Madagascar (épisodes les plus sévères et les mieux documentés). Trois autres cas d'intoxications par viscères de requins sont survenus en Polynésie française entre 2002 et 2013 (Chinain, communication personnelle), les espèces en cause n'étant pas documentées.

Ailleurs dans le monde, les informations demeurent fragmentaires et non détaillées. Glaziou et Legrand (1994), dans leur revue sur l'épidémiologie de la ciguatera, citent la famille des *Carcharhinidae* dont certaines espèces sont responsables d'intoxication ciguatérique dans différentes régions du monde (Amériques, centre Pacifique et région Asie/océan Indien).

Dans un article de synthèse publié en 1981, Bagnis fournit une liste de poissons dits « ciguatériques » connus dans l'aire Indo-Pacifique, en se basant sur des données qu'il a recueillies lors d'enquêtes épidémiologiques effectuées entre 1965 et 1980. Parmi ces espèces de poissons figurent plusieurs espèces de requins (tableau 1, page suivante).

Tableau 1. Liste de requins dits « ciguatériques » identifiés par Bagnis (1981).

Espèces	océan Pacifique						océan Indien	Caraïbes
	Polynésie française	Samoa	Tonga	Fiji	Vanuatu	Nouvelle Calédonie	Mascareignes*	Iles Vierges
<i>Carcharhinus amblyrhynchos</i> requin gris de récif	+	+			+			
<i>C. melanopterus</i> requin à pointes noires		+						
<i>C. plumbeus</i> requin gris			+		+	+	+	
<i>Galeocerdo cuvieri</i> requin tigre		+		+				
<i>Isurus paucus</i> petit requin taupe			+		+	+		
<i>Triaenodon obesus</i> requin pointe blanche	+	+						
<i>Sphyrna lewini</i> requin marteau								++

* Les Mascareignes sont un archipel de l'océan Indien formé de trois îles principales, La Réunion, l'île Maurice et Rodrigues, ainsi que plusieurs petites îles proches.

Le signe + correspond à une toxicité exceptionnelle, très limitée dans le temps et l'espace. Le signe ++ correspond à une toxicité de caractère régional, pour les spécimens de grande taille.

A Madagascar, le premier épisode décrit est celui de Manakara (côte Sud-Est) en 1993, qui s'est distingué par sa gravité sans précédent. Plusieurs centaines de personnes (entre 200 et 500 selon les différents auteurs) ont été intoxiquées suite à la consommation d'un requin (requin bouledogue (*Carcharhinus leucas*) ou requin balestrine (*C. amboinensis*), 2 espèces difficiles à discriminer). Cet épisode a été mortel pour 60 à 98 personnes selon les différents auteurs soit une létalité de 20 à 30% (Habermehl et al., 1994 ; Boisier et al, 1995 ; Quod et al., 2001).

Suite à cet événement sévère, des enquêtes menées par les autorités locales ont permis de mieux cerner la situation à Madagascar. De 1930 à 1997, plus de 83 épisodes d'intoxications par consommation de requins ont été recensés, touchant 1855 personnes. Les requins sont responsables de 48% des cas graves d'intoxication, la majorité d'entre eux étant observée sur la côte Est malgache dans la province de Toamasina (Champetier de Ribes et al, 1999). Dans les formes modérées d'intoxications, les requins représentent 35% des épisodes (n=71). Dans l'ordre des Carcharhiniformes, deux familles de requins sont les plus souvent citées dans les formes graves et modérés : les *Sphyrnidae* (requins marteau) et les *Carcharhinidae* (requins requiem). Une analyse plus fine de l'enquête a permis de recenser, entre 1993 et 1998, 1269 intoxications par des requins dont 68 décès (Champetier de Ribes et al., 1998). Les principales espèces mises en cause dans 8 épisodes sévères appartiennent aux trois familles suivantes :

- *Carcharhinidae* : *Carcharhinus leucas* (requin bouledogue, 2 fois), *C. amboinensis* (requin balestrine, 2 fois), *Galeocerdo cuvier* (requin tigre, 1 fois)
- *Sphyrnidae* : *Sphyrna lewini* (requin marteau, 1 fois), *S. mokarran* (grand requin marteau, 1 fois)
- *Hexanchidae* : *Hexanchus griseus* (requin gris, 1 fois), de l'ordre des Hexanchiformes.

Quelques résultats d'analyse par bio-essai sur souris sont présentés dans le tableau 2 (page suivante).

Les épisodes sont survenus surtout sur la côte est : districts sanitaires de Vohipeno, (2 fois), Manakara, Sambava, Maroantsetra, Mahanoro, mais aussi sur la côte Sud : Taolagnaro et sur la côte Sud-Ouest : Toliara II.

L'apparition des signes cliniques est précoce, le délai est de moins de 6h après le repas en cause dans la grande majorité des cas et ne dépasse jamais 24h. La durée des signes s'étend de quelques heures à 15 jours. Le taux d'attaque s'étend de 20 à 100%. La létalité varie de 0 à 32% des sujets malades. Les signes neurologiques sont toujours prédominants et présents dans tous les épisodes touchant entre 50% et 100% des sujets intoxiqués (en moyenne 80%) :

- neurosensitifs (100% des épisodes) à type de paresthésies (fourmillements des extrémités, sensation de brûlure des lèvres), de myalgies et d'arthralgies, de céphalées
- neuromoteurs (60% des épisodes) à type de troubles de l'équilibre, troubles de la marche
- neurosensoriels (20% des épisodes) à type de diplopie, vision floue
- troubles de la conscience (40% des épisodes) : obnubilation, coma.

Les signes digestifs se retrouvent aussi tous les épisodes et touchent entre 5% et 100% des sujets intoxiqués (en moyenne 40%). Ce sont essentiellement des vomissements, diarrhées, douleurs épigastriques, et plus rarement stomatites (observées chez quelques sujets intoxiqués au cours d'un épisode) et ictères (observés chez quelques sujets intoxiqués au cours d'un épisode).

Les signes généraux sont moins fréquents (50% des épisodes), surtout marqués par l'asthénie, les vertiges et la fièvre (Champetier de Ribes et al., 1998).

Tableau 2. Quelques résultats d'analyse par bio-essai sur souris de requins impliqués dans des intoxications alimentaires à Madagascar

Sources : i) Atelier sur la prévention et le contrôle des intoxications par consommation d'animaux marins à Madagascar, 21-23 avril 1998, Recueil de présentations. Ministère de la Santé, Ministère de la Pêche et des Ressources Halieutiques et ii) Champetier de Ribes et al. (1998).

Date et lieu	Nombre de consommateurs	Taux de malades	Symptômes	Espèce de requins	Toxicité
Novembre 1993 Manakara	188	100%	neurologiques	<i>Carcharhinus leucas</i> requin bouledogue	30 US par g de foie
Octobre 1995 Tolagnaro	62	100%	neurologiques	requin non identifié	< 0,1 US par g de chair < 1,7 US par g de foie 5,3<x<10 US par g de foie
Novembre 1996 Sambava	80	21%	neurologiques	<i>C. amboinenses</i> requin balestrine	0,163 ng par g de chair
Décembre 1996 Mahanoro	324	61%	digestifs	<i>Sphyrna mokarran</i> grand requin marteau	1,82 ng par g de chair
Décembre 1997 Toliara	145	82%	neurologiques	<i>Carcharhinus leucas</i> requin bouledogue	chair : 8 US par g de chair foie : 0

(dans ce tableau, US : unité souris, correspond à la quantité de toxines entraînant la mort en 24h d'une souris pesant entre 16 et 22 g selon les études. La quantité de toxines n'est pas rapportée à 1 g de souris, on parlerait dans ce cas de USg).

Depuis 1998, deux foyers d'intoxications suite à la consommation de requins ont été rapportés très récemment, l'un dans le district de Fenerive-Est en novembre 2013, et l'autre dans le district de Toamasina II en février 2014 (Figure 2, page suivante). Selon les informations transmises à l'Anses par l'Institut de Veille Sanitaire en date du 22 avril 2014 :

- concernant Fenerive-Est, 124 personnes ont été intoxiquées suite à un repas (viande de requin) pris le 10 novembre 2013, dont 9 sont décédées. Des restes de repas ont été récupérés et analysés dans le cadre d'une convention de recherche et de développement

- mise en œuvre par l'Anses et détaillée plus loin dans ce rapport ; l'analyse génétique a permis de conclure qu'il s'agissait d'un requin bouledogue ;
- concernant Toamasina II, 4 personnes ont été intoxiquées suite à un repas (viande de requin) pris le 11 février 2014, dont 1 est décédée. Les restes de repas étaient en mauvais état et n'ont pas été récupérés (pas d'analyse prévue).

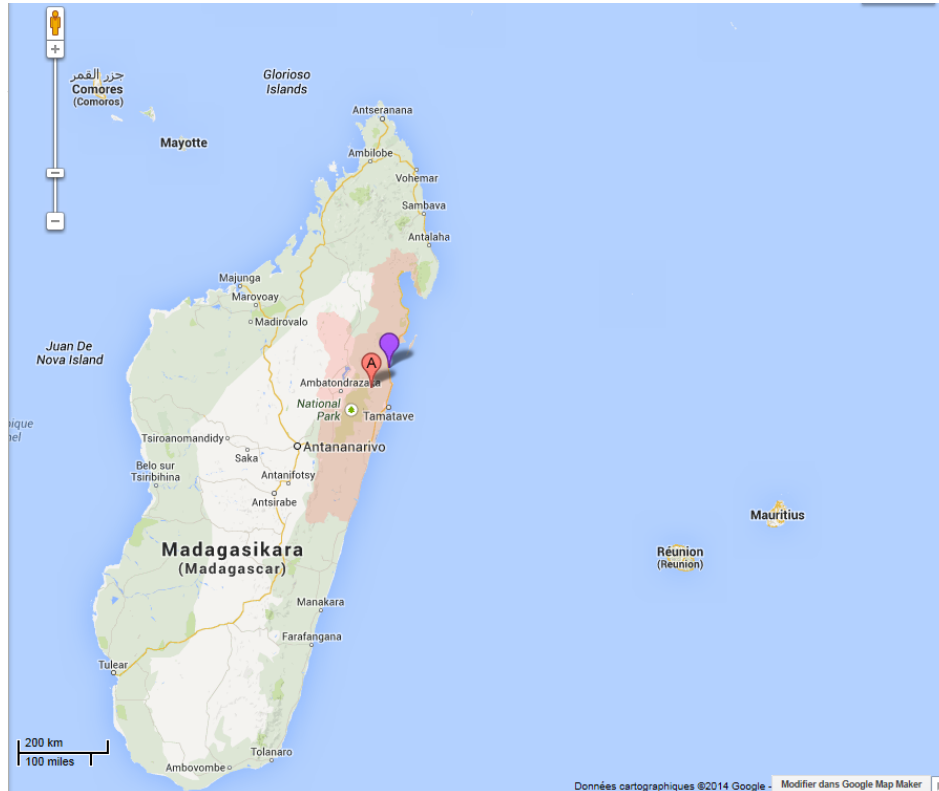


Figure 2 : Carte présentant la localisation des districts Fénérive Est (violet) et Toamasina II (rouge)

A La Réunion, un foyer d'intoxication de cinq personnes a été rapporté en 1993 suite à la consommation de chair de requin pêché dans la baie de Saint-Paul, l'espèce causale n'a pas été formellement identifiée. Les symptômes associaient graduellement asthénie, céphalées, douleurs abdominales, diarrhées, vomissements, hallucinations, arthromyalgies, paresthésies péri-buccales et distales des membres. Un des malades a présenté des symptômes cardiaques nécessitant une admission en réanimation, avec une bradycardie sinusale ayant persisté un mois, les myalgies et l'asthénie ont persisté 3 mois (Le Bouquin et al., 1993).

Ciguatoxines ou carchatoxines ?

Il a été avancé que les intoxications suite à la consommation de requins présentaient un tableau clinique différent de la ciguatéra classique et qu'elles pourraient être dues à d'autres toxines ayant des propriétés similaires, appelées carchatoxines (Yasumoto, 1998 ; Champetier de Ribes et al., 1998 ; Turquet et al., 2000 ; Gatti et al., 2008).

Ce type d'intoxication par les requins reste à ce jour rencontré dans des formes sévères essentiellement à Madagascar. Des différentes enquêtes épidémiologiques menées sur place, le tableau clinique (tableau 3, page suivante) montre une prédominance des signes neurologiques et sensoriels (dominés par des troubles de la conscience, des douleurs musculaires et articulaires) et une forte mortalité. Dans le cas de la ciguatéra par consommation de poissons de récif de l'océan Indien, les premiers symptômes sont surtout gastro-intestinaux et sont associés à des manifestations seurosensitives ; la mortalité demeure exceptionnelle (Champetier de Ribes et al., 1998 ; Turquet et al., 2000).

Tableau 3 : Diagnostic différentiel des intoxications par consommation de requins et de poissons de récif de l'océan Indien (Turquet et al., 2000)

Type (animal en cause)	Signes cliniques
Carchatoxisme (requins)	<p><i>Temps de latence</i> : 2 à 12 h en moyenne.</p> <p><i>Signes cliniques</i> : Prédominance des signes neurologiques (paresthésies des extrémités, dysesthésies superficielles, arthralgie, vertiges et troubles visuels) associés à des signes digestifs modérés et inconstants. Dans les formes graves, s'ajoutent ataxie, dysarthrie, trouble de la conscience allant de l'obnubilation au coma ainsi qu'une arythmie cardiaque et une détresse respiratoire.</p> <p><i>Mortalité</i> : 7 à 30 %</p>
Ciguatera (poissons de récif)	<p><i>Temps de latence</i> : 2 à 12 h en moyenne.</p> <p><i>Signes cliniques</i> : Tableau de gastro-entérite banale associée à des manifestations neurosensitives caractéristiques (paresthésies des extrémités et péri-buccales, dysesthésies superficielles, inversion de la sensation chaud/froid ou allodynie). La symptomatologie se complète par des myalgies et des arthralgies, un prurit d'intensité variable et une asthénie lentement résolutive. Les formes graves (5 %) sont dues à des tableaux de déshydratation par diarrhée persistante, de collapsus cardio-vasculaire par trouble du rythme et chute tensionnelle, de dyspnée par atteinte des muscles respiratoires.</p> <p><i>Mortalité</i> : Exceptionnelle.</p>

Par ailleurs, les restes du repas du cas de Manakara de 1993 ont été testés par bio-essai sur souris et ont provoqué les mêmes types de symptômes que les ciguatoxines à une différence près : les échantillons de requin ont entraîné la mort des souris dans les 4h après l'injection (pas de mortalité observée au-delà de 4h) tandis que dans le cas des ciguatoxines, la mort des souris a été observée même après 24h (Boisier et al., 1995). La toxicité était de 30 US (unité souris, correspond à la quantité de toxines entraînant la mort de la souris en 24h, la quantité de toxines n'est pas rapportée à 1 g de souris) par gramme de foie de requin (Champetier de Ribes et al., 1998).

Ces restes ont également été analysés par le Pr. Yasumoto (1998) qui a mis en évidence la présence de nouvelles toxines qu'il a dénommées **carchatoxines A et B**. Mais l'origine de cette forme d'intoxication reste encore inconnue.

Néanmoins, il n'est pas exclu que ces toxines puissent être de nouveaux analogues de ciguatoxines, par exemple des formes très oxydées.

2.3 Autres données de contamination des requins par des ciguatoxines (ou par des toxines ayant des propriétés similaires)

Dans une étude publiée en 1980, Randall présente les résultats d'une vaste campagne réalisée dans les Iles Marshall (situées dans l'océan Pacifique au nord des îles Gilbert) ayant porté sur 807 spécimens de poissons dont 32 requins. Ces échantillons ont été testés par bio-essai sur mangouste, qui consiste à nourrir les animaux avec des portions représentant 10% de leur poids corporel avec le foie accompagné ou non des viscères, sauf pour les requins pour lesquels seuls les muscles sont utilisés. La mangouste a été utilisée en raison de la ressemblance de ses symptômes avec ceux observés chez l'homme, en raison du fait qu'elle ne régurgite pas (contrairement au chat) et parce qu'il était facile de s'en procurer sur l'île d'Hawaï où se trouvait le laboratoire d'analyse. Parmi les 32 échantillons de requins testés, 30 ont donné un résultat négatif et 2 ont donné un résultat positif (1 requin gris de récif *Carcharhinus amblyrhynchos* et 1 requin bordé *Carcharhinus limbatus*). Les 3 spécimens de requins tigres testés n'ont pas donné de

résultat positif. Il convient de rappeler que seule la chair a été testée, ni le foie ni les viscères ne l'ont été.

Dans un rapport daté de 1966, Brock et al. présentent les résultats d'études conduites de 1963 à 1965 dans l'atoll Johnston (situé dans l'océan Pacifique, à l'ouest d'Hawaï) ayant porté, entre autre, sur 82 spécimens de requins (46 requins pointe blanche *Trienodon obesus* et 36 requins soyeux *Carcharhinus menisorrah*). Le bio-essai sur mangouste, utilisé cette fois avec le foie des requins, a révélé 11 échantillons positifs (7 requins pointe blanche et 4 requins soyeux). Les auteurs estiment que la toxicité des échantillons a été sous-évaluée car les mangoustes ingèrent rarement la totalité de la portion administrée.

Le GT attire donc l'attention sur le fait que, dans le cas des requins, les toxines à prendre en compte sont non seulement les ciguatoxines mais qu'il existe potentiellement un autre type de toxines dénommées jusqu'à présent carchatoxines, dont la structure n'a pas encore été élucidée. Néanmoins, il n'est pas exclu que ces toxines puissent être des analogues non connus de ciguatoxines, par exemple des formes très oxydées.

3 Éléments de réponse à la Question 2

Rappel de la Question 2 :

Quelles sont les méthodes analytiques actuellement applicables à la détection et à la quantification des ciguatoxines dans la chair de requins? Les résultats issus de ces méthodes peuvent-ils être utilisés pour mener une évaluation des risques sanitaires liés à une éventuelle autorisation de ces espèces pour la consommation humaine dans cette zone?

Dans le cas où l'Anses identifierait une méthode d'analyse des ciguatoxines dans la chair de requins suffisamment fiable, quelles données seraient nécessaires pour mener cette évaluation et quelles recommandations pourraient être émises concernant le protocole de prélèvement du requin tigre et du requin bouledogue à La Réunion? Il sera notamment pris en compte la zone géographique concernée et l'éthologie de ces deux espèces de requins en termes de capacité de déplacements dans les eaux marines réunionnaises.

3.1 Introduction

Des revues ont été publiées récemment (Caillaud et al., 2010 ; EFSA, 2010) rapportant l'existence de diverses méthodes analytiques pour la recherche des ciguatoxines utilisant différents principes.

Des méthodes sont basées sur les propriétés toxicologiques ou fonctionnelles des CTXs :

- les essais sur animaux, en particulier le bio-essai sur souris ;
- le test de cytotoxicité fondé sur les effets des toxines sur la viabilité de lignées neuronales Neuro-2a en culture ;
- le test fonctionnel RBA (*Receptor Binding Assay*), utilisant la reconnaissance entre le ligand-CTX et les canaux sodium dépendant du potentiel (CSDP) des membranes des cellules nerveuses et musculaires.

Des méthodes sont basées sur les structures moléculaires des CTXs :

- les tests immunologiques, utilisant la reconnaissance entre les CTXs et des anticorps anti-CTXs ;
- les analyses chimiques notamment la LC-MS/MS (chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem, en anglais *Liquid chromatography-mass spectrometry* ou *LC-MS*).

Leurs principes généraux, avantages et inconvénients sont présentés dans les paragraphes suivants. En préalable, un état actuel des connaissances sur la structure chimique des CTXs est également exposé.

3.2 Chimie des ciguatoxines

Les travaux scientifiques les plus avancés concernent la région de l'océan Pacifique. Ainsi, le groupe du Pr. Yasumoto, a particulièrement contribué depuis 1975 à la caractérisation de toxines produites par les microalgues du genre *Gambierdiscus* ainsi que des métabolites produits de transformations rencontrés dans les poissons (Yasumoto, 2001; Yasumoto et al., 2000). Deux structures de base de toxines ont été décrites, et leurs métabolites identifiés (Figure 3, page suivante).

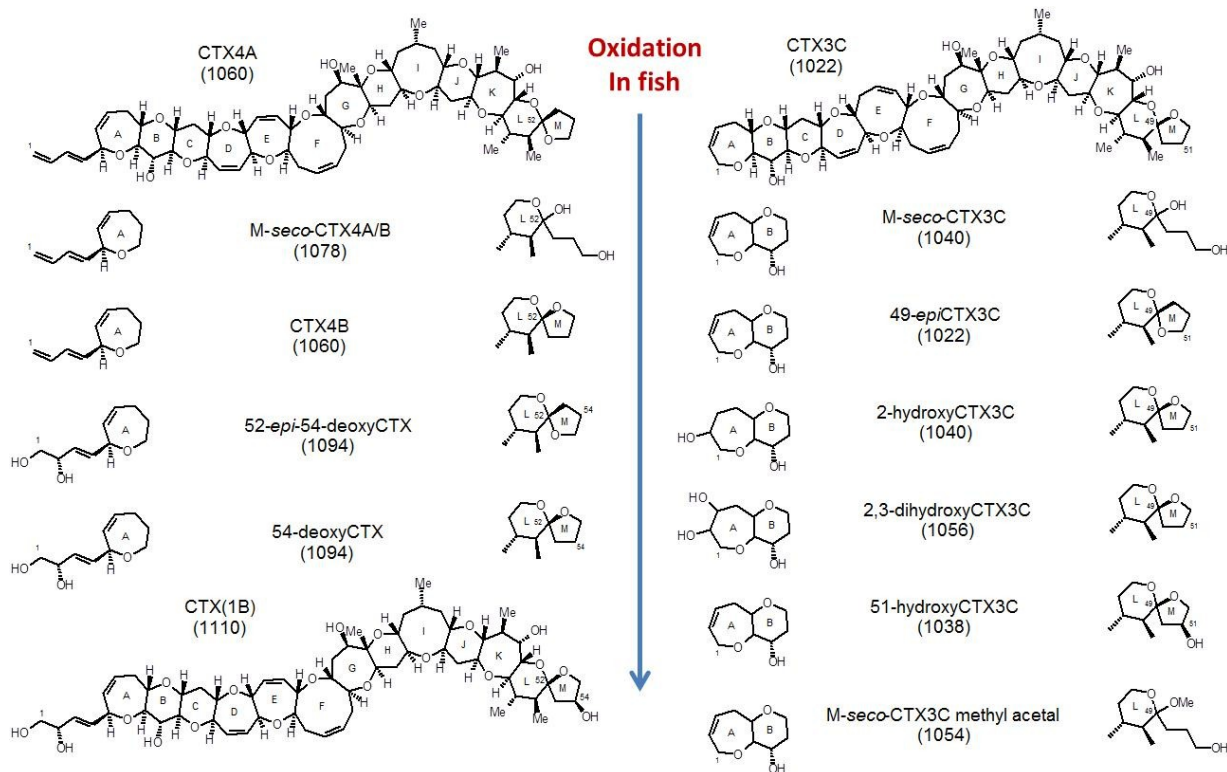


Figure 3. Métabolisation des ciguatoxines algales par les poissons dans l'océan Pacifique
(adapté de Yogi et al., 2014).

Certains de ces métabolites ont été également observés dans les microalgues mêmes, ou dans les extraits et fractions purifiées d'une souche de *Gambierdiscus polynesiensis* (Chinain et al., 2010).

Deux analogues des CTXs ont été décrits comme caractéristiques des poissons de la zone des Caraïbes, la C-CTX-1 et son épimère la C-CTX-2 (Lewis et al., 1998). Bien que les différences structurales puissent être caractérisées de mineures avec les P-CTXs (par exemple avec un spiro acétal stable car fermé chez les P-CTXs comparé à un hémiacétal instable car ouvert chez les C-CTXs, des oxydations différentes sur 5 carbones quaternaires pour les C-CTXs contre 2 pour les P-CTXs, Figure 4, page suivante), les conséquences sont majeures en termes de stabilité des toxines (stable pour les P-CTXs, instable pour les C-CTXs) et de toxicité chez la souris (toxicité des C-CTXs dix fois moindre que celle des P-CTXs). De plus, les épitopes font que des anticorps anti P-CTXs ne reconnaissent pas des C-CTXs. La comparaison point par point peut être trouvée dans les travaux de Pottier et collaborateurs (2001).

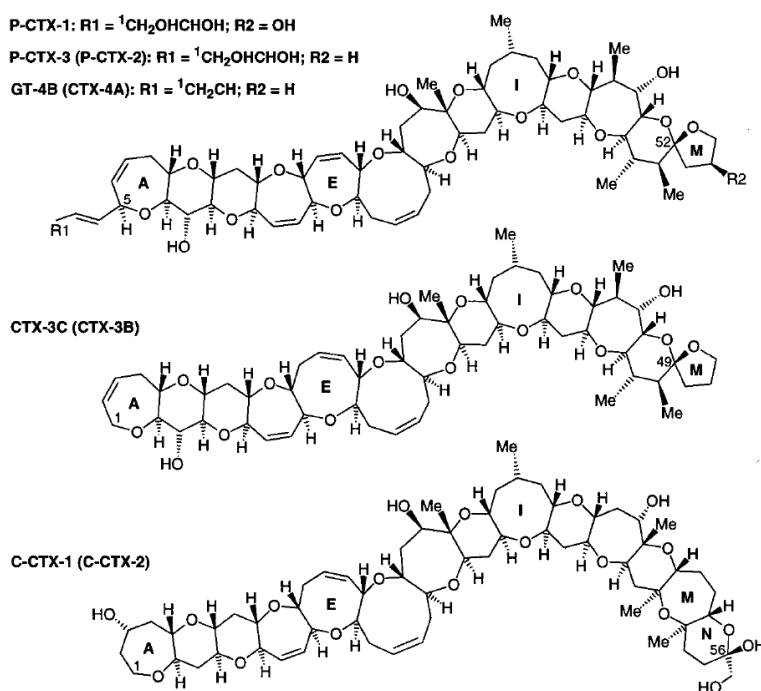


Figure 4. Comparaison des structures de CTXs en provenance de l'océan Pacifique (P-CTXs) avec celles des Caraïbes (C-CTXs) (Lewis et al., 1998)

Peu d'études ont pu être conduites pour caractériser les CTXs de l'océan Indien (I-CTXs). Hamilton et al. (2002) ont montré que les I-CTXs avaient un profil d'éluion en chromatographie différent de celui des CTXs des Caraïbes (C-CTXs) (Figure 5).

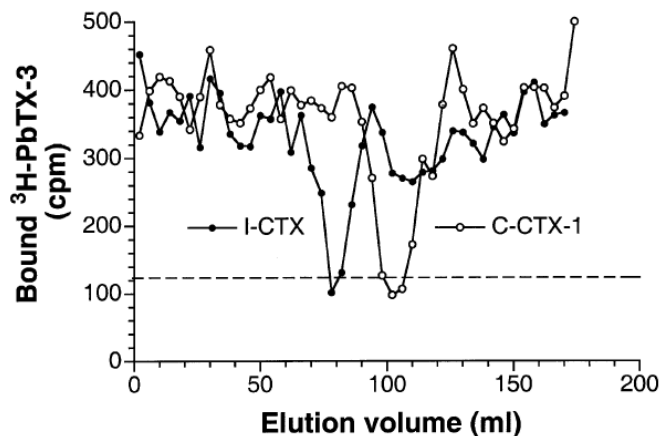


Figure 5. Profils d'éluion des CTXs de l'océan Indien (I-CTX) et des Caraïbes (C-CTX-1) avec 2 mL min^{-1} MeOH sur TSK HW-40S, résine d'exclusion de taille moléculaire (Hamilton et al., 2002)

Bien que les valeurs m/z aient été mesurées en spectrométrie de masse pour la I-CTX-1 [$\text{M}+\text{H}$]⁺ (1141.58 Da), les formules brutes n'ont pas pu être confirmées à ce jour, et il n'y a donc pas de structure exacte connue pour cette famille des I-CTX. De plus, bien que la masse nominale (arrondie à l'entier le plus proche) de la I-CTX-1 corresponde à celle de la C-CTX-1 (1141 Da), le spectre d'éluion chromatographique de la I-CTX-1 ne correspond pas à celui de la C-CTX-1, tel qu'évoqué précédemment (figure 5). Il pourrait donc y avoir des différences significatives entre ces analogues de CTX-1 des deux régions océaniques.

Le tableau 4 (page suivante) présente un état des connaissances sur la diversité des ciguatoxines isolées à partir de poissons ou de microalgues.

Tableau 4. Etat des connaissances sur la diversité des ciguatoxines isolées à partir de poissons ou de microalgues (d'après Caillaud et al., 2010 complété avec les données de Pottier et al., 2002a, b et de Lenoir, 2006)

Origine		Nombre de cycles	Nombre d'atomes de carbone	Exemples de CTXs	Masse moléculaire (Da)	Source
Pacifique (P-)	Type I	13	60	CTX (CTX-1B, CTX-1)	1110,6	poissons carnivores
				CTX-2-A2 (CTX-2, 52-epi-54-deoxyCTX)	1094,5	poissons carnivores
				CTX-2-B2 (CTX-3, 54-deoxyCTX)	1094,5	poissons carnivores
				CTX-4A	1060,8	<i>G. toxicus</i> , <i>G. polynesiensis</i>
				CTX-4B (GTX-4B, Gt 4b)	1060,8	<i>G. toxicus</i> , <i>G. polynesiensis</i> , poissons herbivores
	Type II	13	57	CTX-3C	1022,8	<i>G. toxicus</i> , <i>G. polynesiensis</i> , poissons herbivores
			CTX-2A1 (2,3-dihydroxyCTX3C)	1056,0	poissons carnivores	
Caraïbes (C-)		14	62	CTX-1, -2, -1141a, -1141b, -1141c	1140,7	poissons carnivores
				CTX-1143, -1143a	1142,7	poissons carnivores
				CTX-1157, -1157a, -1157b	1156,7	poissons carnivores
				CTX-1127	1126,6	poissons carnivores
				CTX-1159	1158,6	poissons carnivores
				CTX-1181	1180,6	poissons carnivores
Indien (I-)		non déterminé	non déterminé	CTX-1	1140,6	poissons carnivores
				CTX-2	1140,6	poissons carnivores
				CTX-3	1156,6	poissons carnivores
				CTX-4	1156,6	poissons carnivores
				CTX -5	1038,7	poissons carnivores
				CTX-6	1038,4	poissons carnivores

A partir d'échantillons de requin impliqués dans l'intoxication alimentaire survenue à Madagascar en 1993 (Boisier et al., 1995) Yasumoto (1998) a mis en évidence la présence de composés de nature différente de celle de la ciguatoxine du Pacifique, tout au moins de l'analogue majeur rencontré dans les poissons du Pacifique (P-CTX-1), qu'il a nommé carchatoxines A et B (figure 6, page suivante). Malheureusement, ni la masse moléculaire ni la structure de ces carchatoxines ne sont connues.

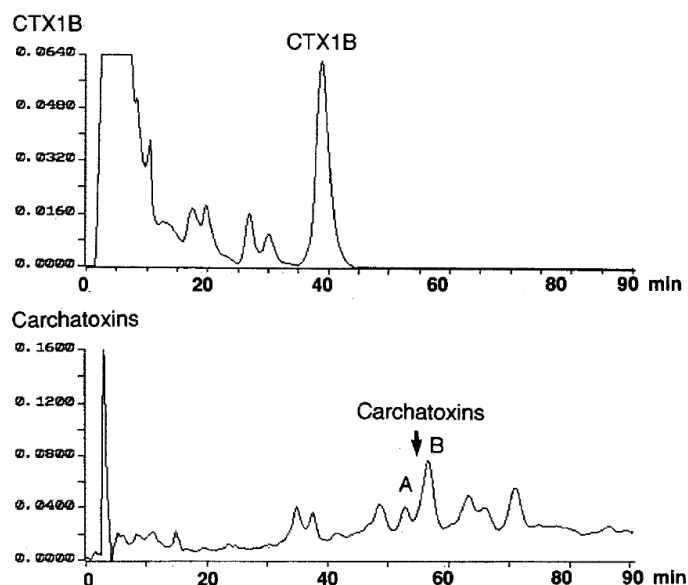


Figure 6. Carchatoxines A et B éluant à un temps différent de la P-CTX-1 en chromatographie en phase reverse (Asahipak ODP-50, 4,6 x 150 mm, 75% MeOH, 1 mL min⁻¹, 210 nm), (Yasumoto, 1998)

3.3 Les essais sur animaux

Les essais réalisés avec des animaux correspondent soit à des tests de nourrissage chez le chat, la mangouste ou le poussin soit à des tests par injection sur des insectes ou chez la souris de laboratoire (Bagnis et al., 1985 ; Vernoux, 1991 ; Granade et al., 1976 ; Labrousse et Matile, 1996). Les essais par nourrissage sont particulièrement intéressants pour l'étude de la toxicité globale d'échantillons de poissons contaminés car les tissus sont testés « en l'état », ce qui évite donc les pertes dues à l'extraction, comme cela a été constaté avec les ciguatoxines en particulier celles de l'océan Indien. Les essais par injection, quant à eux, sont privilégiés pour l'étude d'extraits semi purifiés (Vernoux et Lahlou, 1986 ; Vernoux, 1991).

Le test poussin est le plus intéressant des tests de nourrissage en raison de la présence du jabot qui peut être facilement rempli avec du foie de poisson et du faible poids de l'animal. Il est bien adapté à l'évaluation de la toxicité potentielle des foies de divers poissons (Vernoux et Lahlou, 1986 ; Vernoux et al., 1986). Il a été décrit en détail par Vernoux et al. (1985). Le bio-essai souris est le test par injection de référence et est décrit ci-après.

Le bio-essai sur souris

3.3.1 Principe général du bio-essai sur souris

Le bio-essai sur souris est un test largement utilisé pour détecter les toxines du groupe des ciguatoxines dans les poissons (EFSA, 2010 ; Hamilton et al., 2002 ; Hoffman et al., 1983 ; Lewis and Sellin, 1993 ; Vernoux, 1994). La dose létale à 50% (DL₅₀) par voie intra-péritonéale chez la souris blanche de laboratoire est de 3,6 µg kg⁻¹ p.c. pour la C-CTX-1 et de 0,25-0,35 µg kg⁻¹ p.c. pour la P-CTX-1 ce qui montre sa bonne sensibilité à ces toxines (Pottier et al., 2001).

Le principe consiste à extraire des échantillons de tissus de poisson dans de l'acétone puis de purifier par deux partitions liquide/liquide à l'hexane et au diéther. Cette extraction fait appel au caractère lipophile des ciguatoxines qui peut être classé comme moyen (**polarité moyenne** du même ordre que celle des aflatoxines) à cause de la présence dans leurs structures de fonctions OH polaires sur fond hydrocarboné entrecoupé régulièrement de fonctions polyéthers. L'extrait contenant les ciguatoxines est solubilisé dans du tween 60 1-5% salin puis injecté par voie intrapéritonéale (i.p.) à une souris (20 ± 2 g). Deux souris sont observées continuellement pendant les deux premières heures, puis contrôlées régulièrement jusqu'à 24h après injection.

L'interprétation des résultats repose sur les symptômes observés et le délai de survie des souris. Les symptômes typiques de la présence de CTXs sont une diarrhée profuse, une piloérection, des troubles respiratoires, une dyspnée et lorsque l'on utilise des souris mâles, une cyanose transitoire préérectionnelle du pénis (qui peut aller jusqu'au priapisme). Dans le cas de l'océan Indien, ce dernier symptôme n'est observé que très rarement. Il ne figure donc pas dans le descriptif classique pour cette région. La mort de 1 ou 2 souris dans les 24h est interprétée comme un résultat positif pour la présence de ciguatoxines (échantillon non comestible).

La limite de quantification déterminée par Lewis (Lewis and Sellin, 1993) est de $0,5 \text{ nmol kg}^{-1}$ soit $0,56 \mu\text{g P-CTX-1 kg}^{-1}$ de chair. La relation dose vs temps de mortalité est utilisée pour la quantification et la mortalité est exprimée en US (unité souris). Pour un mélange de ciguatoxines dans des poissons cette relation est estimée par l'équation $\log(\text{US}) = 2,3 \log(1+1/T)$, où US est le nombre d'unités souris, mais dans cette définition elle correspond à la DL_{50} (1 US = DL_{50} , dose à laquelle on observe la mortalité de la moitié de la population de souris de 20 g exposées) et T le délai entre l'injection et la mort de la souris. La relation $\log(1+1/T)$ a été établie en injectant des concentrations d'étalon pur de 2,5 à 70 ng P-CTX-1 (0,45-12,5 US) à l'espèce de souris locale (Lewis and Holmes, 1993). Une unité souris US (DL_{50} souris 20 g) équivaut à 5 ng P-CTX-1 (Lewis et al., 1991).

Ces notions de relation dose–temps de survie ont aussi été développées antérieurement pour les ciguatoxines des Antilles avec détermination d'un temps de survie minimal (Vernoux, 1986). L'intérêt de ces travaux, contrairement aux précédents, est la détermination du temps de survie minimal (significatifs à $P < 0,1\%$) dont la réalité expérimentale peut être atteinte par injection de fortes doses à 5 doses léthales minimales (DLM) ou 10 DLM, détermination qui ne semble pas dépendre du degré de pureté des extraits injectés (Vernoux et Talha, 1989). Des ciguatoxines à action rapide c'est-à-dire à temps de survie minimal $t_{\text{sm}} < 10 \text{ min}$ avec hypersalivation précoce et spasmes respiratoires violents à l'origine de la mort, sont alors distinguées de celles à action lente qui ont une $t_{\text{sm}} < 29 \text{ min}$ avec les mêmes symptômes mais qui apparaissent plus tardivement.

L'annexe 3 présente une description détaillée de différentes variantes du bio-essai sur souris.

3.3.2 Bilan des protocoles du bio-essai sur souris décrits

Les principales étapes d'extraction de l'ensemble de ces méthodes sont très similaires. Elles comprennent une extraction à l'acétone suivie de deux purifications liquide/liquide à l'hexane et diethyl éther (ou inversement). Wong et al. (2009) proposent une purification supplémentaire sur Florisil. Les quantités de solvant sont très importantes, l'extraction à l'acétone varie d'un ratio 3/1 (Lewis, 2003) à 1/1 (LNR). Les lavages à l'hexane sont réalisés au moins deux fois ainsi que la plupart des partitions à l'éther diéthylique.

Il est important de constater que la quantité injectée aux souris peut varier d'un facteur 2,5 en équivalence de chair de poisson par g de souris injectée. L'augmentation de ce facteur est limitée par les interférences dues aux extraits lipidiques qu'il engendre. Le tableau 5 (page suivante) présente la synthèse de ces variantes dans les protocoles analytiques.

Les résultats des bio-essais dépendent des extraits d'éther partiellement purifiés injectés aux souris et des réponses de toxicité de celles-ci. Tant la quantité que la qualité de résidus lipidiques (présence d'autres composés toxiques) peuvent varier d'une espèce de poisson à l'autre.

Tableau 5. Synthèse de différentes variantes du bio-essai sur souris

	Méthode LNR	Vernoux 1994	Lewis 2003	Wong 2009
Cuisson		70°C	70°C	70°C
Homogénéat	100 g	50 g	100 g	100 g
Extraction	acétone (2x100 mL)	acétone (150 mL) puis acétone 80% (30 mL)	acétone (2x300 mL)	acétone (2x300 mL)
Evaporation	phase acétone	phase acétone	phase acétone	phase acétone
Reprise	extrait repris dans H ₂ O (→40mL)	30 ml H ₂ O repris avec 10ml EtOH (→40mL)	extrait repris dans MeOH 90% (→50mL)	extrait repris dans MeOH 90% (→50mL)
1^{ère} purification liquide/liquide	2x160 mL éther diéthylique	2x40 mL éther diéthylique	2x50 mL hexane	2x50 mL hexane
Evaporation	phase éther	phase éther	phase méthanol	phase méthanol
Reprise	20 mL MeOH 80%	25 mL MeOH 80%	50 mL EtOH 25%	50 mL EtOH 25%
2^{nde} purification liquide/liquide	2x40 mL hexane	2x50 mL hexane	3x50 mL éther diéthylique	3x50 mL éther diéthylique
Evaporation	phase méthanol	phase méthanol	phase éther	phase éther
Reprise	3-5 mL EtOH		chloroforme-méthanol (97:3)	chloroforme-méthanol (97:3)
Evaporation	phase éthanol		extrait sec pesé	extrait sec pesé
SPE Florisil 500 mg/3 mL				dépôt 20-40mg dans hexane/acétone 4 :1 élution acétone / MeOH 7:3 (8 Vm) évaporation
Solubilisation	1 mL tween 60 1%	2 mL tween 60 1% / salin	1 mL tween 60 1-5% / 0,9% salin	1 mL tween 60 1-5% / 0,9% salin
Bio-essai i.p.	injection 0,5 mL / souris 2 souris M 18-22 g eq. 2,5 g chair poisson/g souris	injection 0,04 mL g ⁻¹ souris 2 souris 18-24 g eq. 1 g chair poisson/g souris	injection 0,1-0,5 mL / souris (soit 20 mg) 2 souris MF18-22 g	injection 0,5 mL / souris (soit 20 mg) 2 souris F18-22 g
Interprétation	suivi symptômes, perte de poids et délais de survie	suivi symptômes et délais de survie limite < 0,5 USg g ⁻¹ eq. chair	suivi symptômes et délais de survie toxicité en US	suivi symptômes et délais de survie toxicité en US

Une unité souris (US) est définie comme la quantité minimale de toxine capable de tuer une souris de 20 g en 24 heures après injection intra-péritonéale (ip).

Une USg ou unité souris-gramme est définie comme la quantité de toxines capable de tuer en 24h un gramme de souris au plus dans des conditions d'injection de recherche de la dose létale minimale (DLM) ou de la DL₅₀.

3.3.3 Avantages et inconvénients du bio-essai sur souris

Sur la base de la mise en œuvre de la méthode par le LNR et l'ARVAM dans le cadre des investigations de TIACs ciguatériques et de contrôle à l'importation, les avantages et inconvénients du bio-essai sur souris sont les suivants :

Avantages :

- permet la mise en évidence d'une toxicité globale prenant en compte les diverses ciguatoxines potentiellement présentes, il est particulièrement bien adapté à une mise en œuvre dans le cadre de la toxicovigilance ;
- sur la base de symptômes spécifiques, il est possible de conclure à la présence de CTXs et la relation entre la dose et la survie des souris permet d'estimer la concentration en CTXs de l'échantillon ;
- ne nécessite pas d'équipement instrumental complexe.

Inconvénients :

- faible spécificité ;
- ne donne pas d'information sur l'identité de chaque analogue de ciguatoxines présent ;
- insuffisamment sensible pour détecter des concentrations de CTXs considérées sans risque pour l'Homme. En effet, la limite de quantification est de 0,56 µg P-CTX-1 kg⁻¹ de chair (Lewis and Sellin, 1993) or l'EFSA (2010) a estimé que la concentration sans effet attendu chez l'Homme serait de 0,01 µg équivalent P-CTX-1 kg⁻¹ de chair de poisson ;
- cette méthode ne peut pas être automatisée ; elle est longue et nécessite une grande quantité de solvant ;
- nécessite une quantité importante d'échantillon de poisson (du fait de sa faible sensibilité), ce point est critique lorsqu'il faut confirmer des TIACs sur de petites espèces de poisson ou lorsque la quantité de reste de repas est très faible ;
- requiert des installations spécifiques (animalerie) et seul du personnel qualifié et autorisé peut pratiquer l'expérimentation sur animaux ;
- variabilité des résultats entre laboratoires, en partie due à l'animal (espèce, sexe, âge, poids) ;
- méthode non validée en inter-laboratoires par manque d'étalons commercialement disponibles. Toutefois, des essais d'intercomparaison sont prévus entre l'ARVAM et le LNR avec des échantillons de poisson contaminés ;
- pour des raisons éthiques, de nombreux pays ne souhaitent pas utiliser de bio-essai sur animaux.

3.3.4 Application des essais sur animaux aux échantillons de requins

Le bio-essai sur souris est adapté au contrôle de la chair de requins. Concernant le foie, le requin étant grand prédateur, la présence de divers polluants du milieu marin ou de substances naturelles (comme la vitamine A ou le squalène) en forte concentration peut rendre les extraits toxiques pour la souris et fausser le résultat (Hashimoto, 1979 ; Quod et al., 2001). Des essais avec le poussin pourraient être envisagés, dans les limites qui sont indiquées précédemment et en éliminant les graisses des extraits de foie qui en sont très chargés.

3.4 Le test cellulaire Neuro-2a

3.4.1 Principe

Le test cellulaire Neuro-2a (cellules de neuroblastome murin) est employé régulièrement pour le screening de toxines ciguatériques chez les poissons. Il repose sur la capacité des CTXs à se fixer

sur les canaux sodiques voltage-dépendants (CSDPs), résultant en une augmentation de l'influx d'ions sodium dans la cellule (Manger et al., 1995). L'utilisation combinée d'ouabaïne (qui bloque l'efflux de Na⁺ en inhibant la pompe Na⁺/K⁺ ATP dépendant) et de la veratridine (qui bloque le canal Na⁺ voltage-dépendant en position ouverte) accentue l'influx de Na⁺ pour conduire à la mort cellulaire (i.e. ils agissent comme des potentialisateurs de l'action des CTXs). La limite de quantification du test a été estimée à 0,039 µg éq. P-CTX-1 kg⁻¹ par Déchraoui et al. (2005) et à 0,0096 µg éq. P-CTX-1 kg⁻¹ par Caillaud et al. (2012).

D'autres lignées cellulaires peuvent être utilisées mais les cellules Neuro-2a ont une sensibilité élevée à l'action de neurotoxines (saxitoxines, brévétoxines, palytoxines).

Des cellules Neuro-2a cultivées en plaques de 96 puits sont exposées pendant 24h à un étalon de CTX ou à des extraits de poisson. En disposant de la courbe dose-réponse pour un étalon de CTX (par exemple, un standard pur de P-CTX), la mesure de la mortalité cellulaire permet d'établir les quantités d'équivalents CTXs présents dans le poisson.

Préalablement à la réalisation du test, une mise au point doit vérifier la non-toxicité des extraits de poissons aux concentrations étudiées en absence d'ouabaïne et de veratridine. Cette vérification préliminaire vise essentiellement à caractériser la concentration maximale d'extrait qu'il est possible de tester (CME) et pour laquelle la mort des cellules de Neuro-2a n'est pas imputable à un effet matrice. Cette CME est susceptible de varier en fonction des matrices biologiques testées.

Une description plus détaillée du protocole est présentée en annexe 4.

3.4.2 Avantages et inconvénients du test cellulaire Neuro-2a

Avantages :

- haute sensibilité aux CTXs, il permet de détecter des niveaux de CTXs du même ordre de grandeurs que ceux considérés sans risque pour l'Homme ;
- permet la mise en évidence d'une toxicité globale prenant en compte les diverses ciguatoxines potentiellement présentes et une estimation du contenu en équivalents CTXs ;
- le modèle utilise une lignée cellulaire immortalisée donc stable ce qui favorise la répétabilité analytique ;
- multiples doses et répétitions possibles en plaques de 96 puits ;
- test relativement répandu et mis en oeuvre dans plusieurs laboratoires.

Inconvénients :

- ne donne pas d'information sur l'identité de chaque analogue de ciguatoxines présent ;
- test non validé en inter-laboratoires ;
- possibilités d'interférences selon la nature des matrices ;
- réagit également aux brévétoxines ou d'autres toxines se fixant sur le site 5 des CSDPs.

3.4.3 Perspectives d'application du test Neuro-2a à des échantillons de requins

L'application de ce test aux échantillons de requins ne devrait pas présenter de difficulté. Néanmoins, il sera nécessaire de vérifier l'absence d'un effet matrice aux concentrations testées. Le test permet d'évaluer le potentiel toxique des échantillons et d'estimer le contenu en équivalents CTXs de l'étalon utilisé mais il ne permet pas d'identifier les analogues de CTXs présents.

3.5 Le test Radioligand-Récepteur ou « Radioligand Binding Assay » (RBA)

3.5.1 Principe

Le test de radioligand-récepteur ou « Receptor binding-assay » (RBA) est un test neuropharmacologique qui a été proposé pour la première fois dans les années 80 par Poli et al. (1986), dès lors qu'il a été possible d'isoler des canaux sodium dépendant du potentiel (CSDPs) à partir de tissu animal.

Ce test se base sur l'affinité spécifique des ciguatoxines (CTXs) pour le site 5 des sous-unités α des CSDPs (Lombet et al., 1987). En effet, ce site est le récepteur de 2 familles de toxines marines polyether : les CTXs et les brevétotoxines (PbTx), synthétisées respectivement par les dinoflagellés *Gambierdiscus* spp. et *Karenia brevis* (Poli et al., 1986 ; Lombet et al., 1987 ; Dechraoui-Bottein, 1999). Dans le cas de la détection des CTXs, le RBA mesure la liaison à ce récepteur d'une toxine radio-marquée, la brevétotoxine tritiée ($[^3\text{H}]\text{PbTx-3}$), en compétition avec les CTXs non radiomarquées, contenues dans l'extrait à tester (Poli et al., 1986 ; Lombet et al., 1987).

L'activité de liaison des PbTx et des CTXs a été testée sur différents types de tissus (cellules du cerveau, de muscles cardiaques et squelettiques) de diverses origines : homme, rat, mammifères marins, tortues marines ou tissu neuronal de poisson, mais ce sont les synaptosomes - riches en CSDPs- préparés à partir de cerveaux de rats qui sont les plus communément utilisés (Dodd et al., 1981 ; Dechraoui-Bottein, 1999 ; Bottein Dechraoui et Ramsdell., 2003 ; Caillaud et al., 2010 pour revue).

Une description plus détaillée du protocole est présentée en annexe 5.

3.5.2 Avantages et inconvénients du RBA

Avantages :

- permet de détecter qualitativement et quantitativement les ciguatoxines éventuellement présentes dans un échantillon biologique. Il est particulièrement bien adapté à la détection des CTXs dans des matrices biologiques complexes et variées, telles que les cellules de *Gambierdiscus* (Chinain et al 2010a), le foie et les chairs de poissons (Bottein Dechraoui et al., 2005 ; Darius et al., 2007 ; Chinain et al., 2010b), les cyanobactéries, les bénomies ou encore les oursins (Kerbrat et al., 2010 ; Pawlowicz et al., 2013) ;
- permet la mise en évidence d'une toxicité globale prenant en compte les diverses ciguatoxines potentiellement présentes ;
- sensibilité élevée : ainsi, en utilisant la P-CTX-1 comme étalon, la limite de détection du RBA pour la matrice poisson a été estimée à $0,065 \mu\text{g} \text{ éq. P-CTX-1 kg}^{-1}$ et la limite de quantification à $0,13 \mu\text{g} \text{ éq. P-CTX-1 kg}^{-1}$. Le RBA a également été calibré avec différents standards de ciguatoxines (P-CTX-1, P-CTX-3C) ;
- peut être utilisé avec des extraits bruts ou partiellement purifiés ;
- facilement automatisable pour permettre une grande capacité de traitement, ce qui en fait un outil de choix dans les programmes de monitoring à grande échelle du risque ciguatérique (Bottein Dechraoui et al., 2005 ; Darius et al., 2007 ; Chinain et al., 2010a, 2010b). Le RBA peut se pratiquer en format tube (Lombet et al. 1987 ; Lewis et al., 1991 ; Dechraoui et al., 1999 ; Bottein Dechraoui et al., 2005 ; Darius et al., 2007 ; Chinain et al., 2010a, 2010b), mais le format microplaque est également appliqué avec succès à la détection des saxitoxines (STXs) et tétrodotoxines (TTXs) qui se fixent sur le site 1 des CSDPs (Barchi et Weigele, 1979 ; Van Dolah et al., 1994 ; Doucette et al., 1997 ; Doucette et al., 2000 ; Llewellyn et al., 2001). Depuis la fin de l'année 2011, le RBA réalisé en format microplaque est par exemple devenu l'une des méthodes officielles pour la détection des STXs (AOAC News, 2012).

Inconvénients :

- ne donne pas d'information sur l'identité de chaque analogue de ciguatoxines présent ;
- réagit également aux brévetoxines ou d'autres toxines se fixant sur le site 5 des CSDPs ;
- une généralisation de ce test à un ensemble de laboratoires apparaît difficile en raison des contraintes réglementaires qu'imposent la détention et la manipulation de radioéléments (formation Personne Compétente en Radioprotection, coûts inhérents à la gestion, l'évacuation et la dénucléarisation des déchets radioactifs, etc) ainsi que les difficultés et le coût liés à la synthèse de la brévetoxine radiomarquée.
- test non validé en inter-laboratoires.

3.5.3 Perspectives d'application du RBA à des échantillons de requins

Une étude récente a montré qu'il était possible aujourd'hui de réaliser des analyses RBA au moyen de brévetoxines marquées avec un élément fluorescent le BodipyR-PbTx-2 (McCall et al. 2012). Le RBA fluorescent permettrait ainsi, à terme, de s'affranchir de toutes les contraintes liées à la radioactivité et de « démocratiser » ce test dans les laboratoires. Pour l'heure, il a été appliqué à 4 étalons de brévetoxines différentes (PbTx-1, PbTx-2, PbTx-3 et PbTx-9) et aucune différence significative n'a été relevée entre les valeurs obtenues avec le RBA radioactif vs. fluorescent (McCall et al., 2012). Des études complémentaires sont actuellement en cours pour tenter d'appliquer cette technique à des étalons de CTXs afin de déterminer la spécificité, la sensibilité, la répétabilité, la reproductibilité de ces essais, et confirmer qu'il est bien adapté à un large panel de matrices biologiques (dont la chair de requins).

3.6 Les tests immunologiques

3.6.1 Principe

Plusieurs équipes dans le monde (américaine, japonaise, française) ont mené des recherches sur l'immunodétection des ciguatoxines. Le principe général des tests immunologiques consiste à fixer un anticorps (Ac) spécifique anti-toxine(s) sur l'antigène toxine d'intérêt extrait de l'échantillon puis à révéler cette fixation à l'aide d'un marqueur, telle qu'une enzyme (ex. peroxydase). Le réactif de base est un anticorps produit par un animal de laboratoire suite à l'injection d'un composé toxine-protéine, la toxine se comportant comme un haptène.

Les méthodes développées incluent des radio-immunoessais (l'anticorps est marqué par un radioélément et le dosage mesure un nombre de désintégrations par seconde) et des essais immunoenzymatiques (le dosage est basé sur la réaction d'un substrat adéquat par une enzyme marqueur liée par covalence à l'anticorps, ce qui libère un composant coloré dont la densité optique est mesurée par spectroscopie) comprenant des méthodes ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) avec un dosage immuno-enzymatique sur support solide.

Une description plus détaillée est présentée en annexe 6.

3.6.2 Avantages et inconvénients des tests immunologiques

Avantages :

- spécificité élevée vis-à-vis de la toxine utilisée comme haptène ;
- rapide, facile à mettre en œuvre, faible coût ;
- le principe opératoire permet d'envisager le criblage à haut débit d'échantillons et surtout son utilisation directement sur le terrain par des professionnels de la pêche et des particuliers (sous la forme de kits prêts à l'emploi disponibles dans le commerce) ;
- technique ELISA sandwich prometteuse.

Inconvénients :

- à ce jour, il n'existe pas d'anticorps (polyclonal ou monoclonal) capable de détecter les molécules entières de CTXs. Les seuls anticorps monoclonaux dont il est fait état dans la littérature sont ceux dirigés contre des fragments synthétiques de la P-CTX-1, P-CTX-3C et 51-hydroxyP-CTX-3C (partie droite et/ou gauche de la molécule) (Tsumuraya et al., 2006 ; 2010 ; Pauillac et al., 2000) ;
- ils ne donnent pas d'information sur l'identité de chaque analogue de ciguatoxines présent (sauf si les recherches en cours aboutissent au développement d'anticorps monoclonaux ciblant spécifiquement les analogues de CTXs qui font référence : par exemple P-CTX-1, P-CTX-3C, C-CTX-1, etc) ;
- aucun test n'a été validé en inter-laboratoires. Deux essais de mise au point d'un tel test ont déjà été tentés : le Ciguatetect® et le Cigua-Check®, mais ces kits ont finalement été retirés du marché par manque de résultats concluants, en raison notamment de l'observation d'un fort pourcentage de faux positifs et de faux négatifs (Dickey et al., 1994 ; Bienfang et al., 2011).

3.6.3 Perspectives d'application des tests immunologiques à des échantillons de requins

Du fait de l'absence d'anticorps (polyclonaux ou monoclonaux) ciblant spécifiquement les ciguatoxines de l'océan Indien, il ne semble pas pertinent d'envisager l'utilisation de tests immunologiques pour caractériser le niveau de contamination des requins de l'océan Indien par des ciguatoxines.

3.7 Méthodes physico-chimiques

3.7.1 Etat de l'art

Les méthodes d'analyse chimique comprennent des méthodes de chromatographie liquide avec détection par fluorescence ou par spectrométrie de masse. Les méthodes décrites ci-dessous sont basées exclusivement sur la détection par spectrométrie de masse (LC-MS/MS). En effet, suite à la séparation par chromatographie liquide, les limites de détection et de quantification par spectrométrie de masse sont meilleures que celles de la méthode avec détection par fluorescence (EFSA, 2010).

Pour atteindre des limites de détection et de quantification acceptables, ces méthodes se sont focalisées jusque-là sur la détection des ions du *cluster* pseudo-moléculaire, c'est-à-dire les transitions des ions pseudo-moléculaires envers des ions représentant une ou plusieurs pertes d'eau.

Pour les P-CTXs (du Pacifique), des méthodes ont été présentées par des équipes franco-australiennes et japonaises (Lewis et al., 1999, 2009 ; Stewart et al., 2010 ; Yogi et al., 2011), Figure 7 a), b) et d) page suivante.

L'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux US-FDA (Food & Drug Administration) a également développé une méthode pour la détection de la C-CTX-1 (des Caraïbes) (Abraham et al., 2012 ; Dickey, 2008), Figure 7c page suivante.

Aucune méthode n'a été publiée pour la quantification des I-CTXs de l'océan Indien ou des carchatoxines.

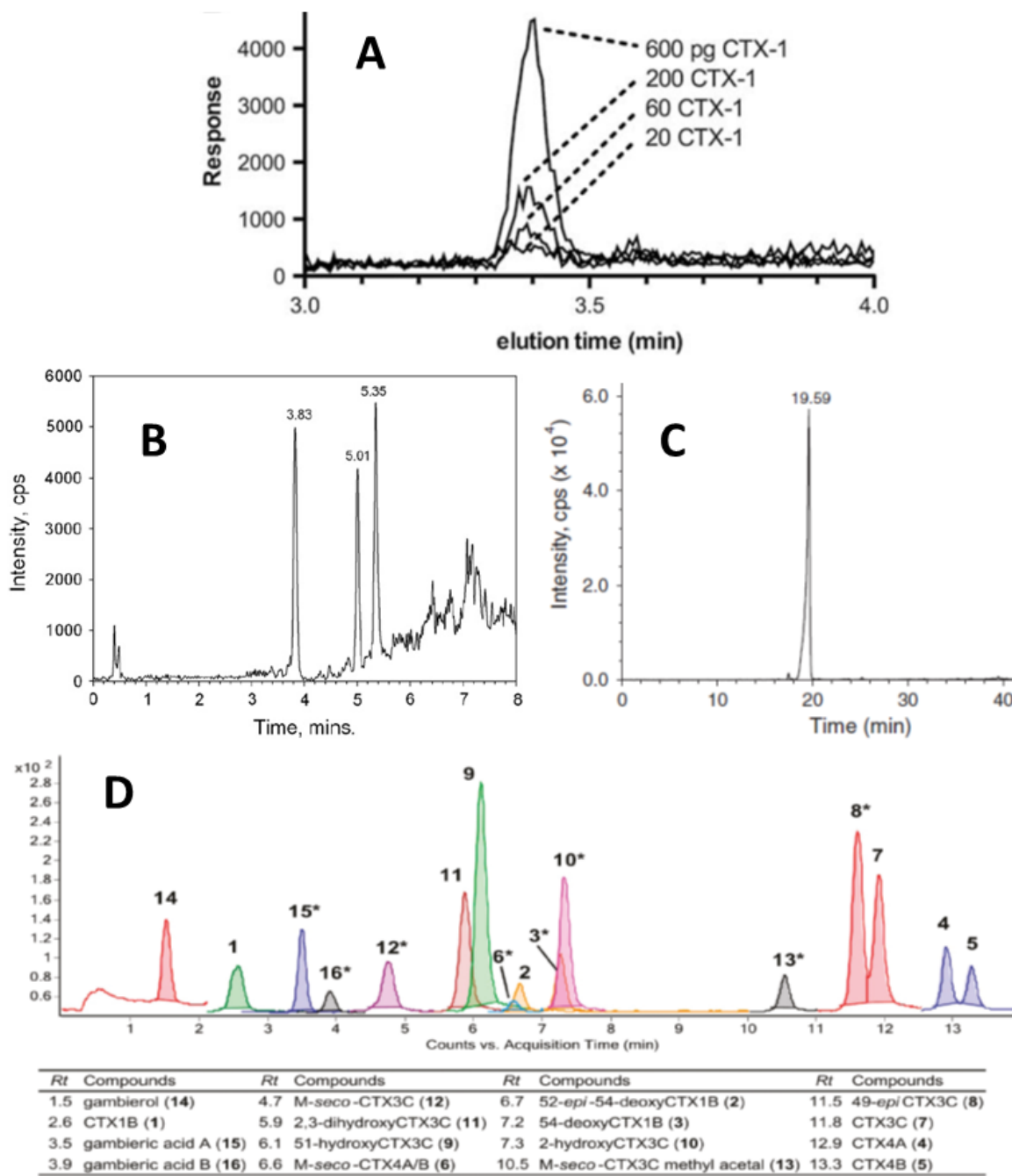


Figure 7. Séparation et limites de quantification des récentes méthodes LC-MS/MS pour les CTXs du Pacifique et des Caraïbes : (A) limite de détection et de quantification (200 et 600 pg, respectivement) sur colonne selon Lewis et al., 2009, (B) P-CTX-1 élue à 3.83 min avec un pic correspondant à 0,8 µg kg⁻¹, selon Stewart et al., 2010, (C) C-CTX-1 dans poisson (reste de repas) pic correspondant à 1,6 µg kg⁻¹ selon Abraham et al., 2012, (D) séparation de 16 composés à environ 1 ng mL⁻¹ selon Yogi et al., 2011.

L'applicabilité des méthodes LC-MS/MS reste néanmoins très limitée dans la mesure où il n'y a pas d'étalon facilement disponible pour la quantification des analogues trouvés dans le poisson. Seul le distributeur japonais WAKO fournit actuellement un étalon non-certié de la CTX-3C, la toxine principale trouvée dans les souches pacifiques de *Gambierdiscus*. Les analogues trouvés dans les poissons, suite à la transformation enzymatique des toxines algales, ne sont disponibles que par le biais de collaborations avec des laboratoires experts (Richard Lewis, Australie ; Takeshi Yasumoto, Japon ; Mireille Chinain, Tahiti). Aucun de ces laboratoires experts n'a pu passer au stade de la certification des analogues purifiés, dû essentiellement aux faibles quantités disponibles de ces toxines même dans ces laboratoires experts.

Une faiblesse commune aux méthodes LC-MS/MS reste le fait qu'elles soient basées sur la détection de transitions correspondant à des pertes d'eau (Lewis et al., 1999, 2009 ; Stewart et al., 2010 ; Dickey, 2008) ou la détection des transitions d'adduits de sodium (Yogi et al., 2011). Ces transitions sont très communes pour tous les composés naturels du type polyéthers ou polyhydroxylés. Cette observation a été démontrée dans de nombreux cas pour les toxines lipophiles telles que l'acide okadaïque (Pleasance et al., 1990), les azaspiracides (Rehmann et al., 2008), les palytoxines (Suzuki et al., 2013). Du fait que cette perte d'eau ne soit pas spécifique aux CTXs, elle ne peut être utilisée que sur des extraits semi-purifiés afin de leur donner une certaine spécificité. **En absence d'étalon pour définir les temps de rétention et les facteurs molaires de réponse sur un spectromètre de masse donné, la LC-MS/MS ne permet de garantir ni l'identité ni la quantité de ciguatoxines présentes.**

Les méthodes LC-MS/MS atteignent typiquement une limite de détection d'environ 0,03 µg eq. PCTX-1 kg⁻¹ de chair de poisson (Stewart et al., 2010). Seule la méthode japonaise récemment présentée prétend à une limite de quantification de 0,01 µg kg⁻¹, limite suffisante pour la législation aux USA (Yogi et al., 2011, US-FDA, 2011).

3.7.2 Avantages et inconvénients des méthodes physico-chimiques

Avantages :

- haute sensibilité aux CTXs ;
- seule technique permettant l'identification des toxines ;
- quantification (en l'absence d'étalons internationaux, par rapport à un contrôle positif propre au laboratoire).

Inconvénients :

- instrumentation complexe ;
- coût de l'analyse élevé ;
- peu adaptée au traitement de nombreux échantillons ;
- méthode non validée en inter-laboratoires.

3.7.3 Perspectives d'application des méthodes physico-chimiques à des échantillons de requins

Du fait des inconvénients présentés ci-dessus, il ne semble pas pertinent d'envisager l'utilisation de la LC-MS/MS pour analyser l'ensemble des échantillons de requins, mais cette technique pourrait être utilisée pour tenter de confirmer la présence de ciguatoxines connues en cas de résultats positifs par d'autres techniques de dépistage.

3.8 Comparaison des méthodes et proposition d'une stratégie analytique

L'objectif est de proposer une stratégie analytique permettant de garantir la sécurité sanitaire des poissons susceptibles d'être consommés. Des éléments favorables au choix d'un outil ou d'une combinaison d'outils analytique(s) en adéquation avec les concentrations des CTXs spécifiques dans les espèces de poissons considérées sans risque pour l'Homme ainsi que son applicabilité sont présentés ci-après. En préalable, un état actuel des données d'évaluation des risques est synthétisé ci-dessous.

3.8.1 Données actuelles en matière d'évaluation des risques notamment des concentrations considérées sans risque pour l'Homme

Aux Caraïbes, dès 1997, la concentration de 1 µg C-CTX-1 kg⁻¹ de poisson avait été proposée comme limite de comestibilité (Vernoux et Lewis, 1997).

Pour la région Pacifique, Lehane et Lewis (2000) ont estimé qu'une concentration de $0,01 \mu\text{g P-CTX-1 kg}^{-1}$ de chair de poisson n'exercerait pas d'effets chez les consommateurs (en se basant sur l'hypothèse d'un repas de 500 g de poisson, d'un facteur de variabilité interindividuelle de 10 et d'une dose minimale causant des effets de $1 \text{ ng P-CTX-1 kg}^{-1} \text{ p.c.}$).

Dickey (2008) a présenté l'analyse de plus de 100 cas d'intoxications ciguatériques aux Etats-Unis entre 1998 et 2008 associés à des régions de pêche Pacifique et Caraïbes. Selon ces travaux, les concentrations dans le poisson susceptibles de causer des effets indésirables chez les consommateurs seraient de l'ordre de $0,10 \mu\text{g} \text{ éq. P-CTX-1 kg}^{-1}$ (Dickey, 2008) ou encore, après conversion, $0,23 \mu\text{g} \text{ éq P-CTX-3C kg}^{-1}$ (Darius et al., 2013). Dickey et Plakas (2010) ont proposé des valeurs guides de $0,1 \mu\text{g} \text{ éq. C-CTX-1 kg}^{-1}$ pour les poissons provenant de régions tropicales de l'Atlantique, du Golfe du Mexique et des Caraïbes et de $0,01 \mu\text{g} \text{ éq. P-CTX-1 kg}^{-1}$ pour les poissons provenant du Pacifique.

Dans un avis rendu en 2010, les experts auprès de l'EFSA (l'Autorité européenne de sécurité des aliments) n'ont pas pu proposer de valeur toxicologique de référence en raison du peu de données expérimentales et épidémiologiques mais ont néanmoins conclu qu'une concentration de $0,01 \mu\text{g} \text{ éq. P-CTX-1 kg}^{-1}$ ne devrait pas induire d'effets chez les individus les plus sensibles.

L'US-FDA (2011) a également fixé un niveau d'action à $0,01 \mu\text{g} \text{ éq. P-CTX-1 kg}^{-1}$ pour les toxines du Pacifique et à $0,1 \mu\text{g} \text{ éq. C-CTX-1 kg}^{-1}$ pour les toxines des Caraïbes.

Bien que le règlement (CE) No 854/2004 du 29 avril 2004 précise que « *des contrôles doivent être effectués [par l'autorité compétente] pour veiller à ce que [...] les produits de la pêche contenant des biotoxines, telles que la ciguatera ou d'autres toxines dangereuses pour la santé humaine, ne soient pas mis sur le marché* », l'UE n'a pas mis en place à ce jour de seuil réglementaire ni défini de méthode(s) analytique(s) de référence applicable(s) aux CTXs.

En France, l'intoxication ciguatérique fait partie des TIAC (Toxi-infection alimentaire collective) à déclaration obligatoire. Le protocole de gestion des intoxications ciguatériques aux Antilles françaises, mis à jour en 2013 par la DGAL, repose sur l'observation du syndrome clinique caractéristique de la ciguatera. Ce syndrome associe des signes digestifs (nausée, vomissements, douleurs abdominales, diarrhées), neurologiques (hyperesthésie, paresthésie, dysesthésie), cutanés (prurit), cardio-vasculaires et respiratoires d'intensité variable.

3.8.2 Comparaison des méthodes décrites

Après avoir considéré certains points communs à la plupart de ces méthodes, elles seront comparées sur la base de leurs avantages et inconvénients listés plus haut.

3.8.2.1 Points communs

► *Considérations sur l'extraction des CTXs à partir de la chair de requins (et éventuellement d'autres tissus).*

L'extraction des tissus de poisson pour une évaluation ultérieure de la présence de CTXs nécessite l'adoption de protocoles qui assurent :

- un taux de récupération élevé des CTXs à partir des différents tissus, minimisant les possibles pertes ;
- l'élimination de substances non souhaitables qui pourraient interférer avec l'exécution des analyses ou des essais.

Plusieurs protocoles d'extraction des CTXs dans des échantillons de poisson sont décrits dans la littérature. Le choix de ces protocoles et la nécessité d'adopter de possibles modifications peut dépendre de la nature des tissus à extraire ainsi que des analyses ou tests à réaliser. Pour ce qui est des CTXs dans la chair de requins, une première approche pourrait être l'adoption de protocoles conventionnels prenant en compte la nature riche en graisse de la matrice de chair de requins. Pour éliminer les graisses, une augmentation des lavages à l'hexane pourrait être retenue, une autre option serait de réaliser la seconde extraction à l'acétone avec 20% d'eau. Des

adaptations peuvent aussi être envisagées dans le cas d'échantillons trop gras comme cela est le cas pour le foie de requins. Par exemple, après cuisson une élimination des graisses surnageantes solidifiées à froid pourrait être un ultime recours puisque les ciguatoxines ne s'accumulent pas dans les parties grasses, à la différence des contaminants lipophiles tels que certains pesticides (Vernoux, 1986).

Les graisses ne sont toutefois pas les seules sources d'interférence rencontrées dans certains des tests évoqués (RBA, Neuro-2a notamment). Sur la base de l'expérience des membres du GT, il s'avère souvent nécessaire de compléter l'étape de partage liquide-liquide par une phase de purification sur cartouche (SPE).

► *Considérations sur les étalons de CTXs*

Un autre élément critique est le manque d'étalons de CTXs, comme relevé lors de la dernière session de formation organisée par le laboratoire communautaire de référence pour les biotoxines marines à Vigo (2-3 mai 2013). Ce manque a pour conséquence, en commun à toutes les méthodes, l'impossibilité :

- de calculer et de vérifier le taux de récupération ;
- de valider ces méthodes en organisant des essais inter-laboratoires.

Néanmoins, les collaborations devraient permettre d'identifier de manière qualitative si les analogues suivants sont présents dans des échantillons de requins : P-CTX-1, P-CTX-3, C-CTX-1, avec un fort besoin d'étude approfondie pour les I-CTXs.

3.8.2.2 Points spécifiques aux différentes méthodes

Le bio-essai sur souris fournit une toxicité globale basée sur la réponse biologique de l'animal aux toxines, avec l'avantage de présenter un tableau clinique caractéristique. Mais il présente de gros inconvénients en termes notamment de sensibilité et de spécificité : la limite de quantification est de $0,56 \mu\text{g P-CTX-1 kg}^{-1}$, alors que la concentration considérée sans risque pour l'Homme est de $0,01 \mu\text{g éq. P-CTX-1 kg}^{-1}$ de chair de poisson (EFSA, 2010 ; US-FDA, 2011). Pour la C-CTX-1, la valeur guide est de $0,1 \mu\text{g éq C-CTX-1 kg}^{-1}$ de chair de poisson (Dickey et Plakas, 2010 ; US-FDA, 2011) or, la limite de quantification du bio-essai sur souris se situerait autour de $5 \mu\text{g de C-CTX-1 kg}^{-1}$ (valeur estimée en utilisant le facteur 10 existant entre la DL_{50} chez la souris de $0,35 \mu\text{g éq P-CTX-1 kg}^{-1}$ p.c. et de $3,6 \mu\text{g éq C-CTX-1 kg}^{-1}$ p.c. souris donnée par Pottier et al., 2001).

Le test cellulaire sur Neuro-2a et le RBA fournissent également une toxicité globale et apparaissent éthiquement plus acceptables que le bio-essai sur souris (bien qu'il soit toujours nécessaire de sacrifier des animaux pour obtenir des récepteurs dans le cadre du RBA, le nombre d'animaux est cependant limité et les animaux ne sont pas exposés à des effets toxiques), mais leur mise en œuvre est plus complexe.

Le test sur Neuro-2a offre une grande sensibilité, avec un seuil de quantification de $0,0096 \mu\text{g éq. P-CTX-1 kg}^{-1}$ (Caillaud et al., 2012). Il permet l'analyse de nombreux échantillons. L'US-FDA l'utilise en combinaison avec la LC-MS/MS en cas de résultat positif (Friedman et al., 2008).

Le test RBA autorise l'emploi d'extraits bruts ou partiellement purifiés. Il est facilement automatisable pour permettre une grande capacité de traitement mais nécessite la manipulation de produits radiomarqués. Des études ont montré une bonne correspondance entre les valeurs de RBA et celles obtenues par bio-essai sur souris, test sur Neuro-2a ou encore par la méthode chimique HPLC/MS en ce qui concerne la détection des PbTx et des CTXs (Dechraoui et al., 1999 ; Pottier et al., 2003 ; Bottein et al., 2005 ; Bottein et al., 2007).

La méthode d'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) est de plus en plus utilisée pour identifier les CTXs dans des poissons mis en cause lors d'intoxications alimentaires (Caillaud et al., 2011 ; Hamilton et al., 2002 ; Hamilton et al., 2010 ; Lewis and Jones, 1997 ; Lewis et al., 1999, 2009 ; Pottier et al., 2002 ; Stewart et al., 2010). Cette méthode, sensible et spécifique, possède une limite de quantification de $0,03 \mu\text{g P-CTX-1 kg}^{-1}$. Elle est particulièrement intéressante pour des concentrations inférieures à la limite de détection du bio-essai sur souris (Wong et al., 2005). Mais elle reste difficilement envisageable dans le cadre de

programmes de surveillance à grande échelle nécessitant le traitement d'un grand nombre d'échantillons et/ou la participation de nombreux laboratoires.

3.8.3 Perspectives et proposition de stratégie analytique

Tout dispositif visant à déterminer le statut de salubrité de denrées alimentaires au regard de leur concentration en contaminants chimiques doit, en intégrant au mieux les critères de faisabilité et des connaissances à un instant t, être établi en prenant en compte la concentration considérée sans risque pour l'Homme et les performances de la méthode analytique en termes de spécificité, sensibilité, robustesse et répétabilité.

Lorsque l'on croise les avantages et inconvénients des méthodes décrites dans ce rapport, le bio-essai sur souris permet de détecter une toxicité globale, il est simple de mise en oeuvre mais il a une limite de quantification (environ 0,5 µg éq. P-CTX-1 kg⁻¹ et 5 µg éq C-CTX-1 kg⁻¹) insuffisante au regard des concentrations de CTXs considérés sans risque pour l'Homme (0,01 µg éq. P-CTX-1 kg⁻¹ et 0,1 µg éq. C-CTX-1 kg⁻¹) par l'EFSA (2010) et l'US-FDA (2011).

A l'inverse, la LC-MS/MS permet d'atteindre un niveau de sensibilité proche de la concentration considérée sans risque pour l'Homme de 0,01 µg éq. P-CTX-1 kg⁻¹, mais elle reste encore une technique sophistiquée nécessitant une compétence de haut niveau, difficilement applicable à de nombreux échantillons à traiter dans un temps court et par un grand nombre de laboratoires. Cette technique apparaît plus adaptée en tant que méthode de confirmation pour tenter d'identifier des toxines connues et caractériser le profil toxinique.

Entre ces deux stratégies, le test de toxicité cellulaire pourrait constituer, à terme, un excellent candidat comme test de référence pour la détection des CTXs (sous condition de validation inter-laboratoires), puisque Caillaud et al. (2012) ont obtenu une limite de quantification de 0,0096 µg P-CTX-1 kg⁻¹. Ce test présente donc une meilleure sensibilité que le RBA (limite de quantification à 0,13 µg éq. P-CTX-1 kg⁻¹). Enfin, de par sa grande modularité vis-a-vis de la détection d'un large panel de biotoxines marines telles que les ciguatoxines, maïtotoxines, palytoxines, saxitoxines, brevéttoxines, etc (Pawlowicz et al., 2013), son utilisation se généralise actuellement à de nombreux laboratoires concernés par la problématique des toxines marines. Pour ce qui est de l'application des protocoles d'extraction pour l'évaluation ultérieure de la réponse de type CTX par les tests cellulaires, si des effets matrices sont rencontrés, des modifications pourraient être proposées.

En résumé et conclusion, afin de déterminer le statut sanitaire d'un échantillon de requin au regard du risque ciguatérique, il est recommandé d'employer une combinaison des techniques suivantes :

- un bio-essai sur souris, afin de rechercher s'il y a une toxicité globale dans l'échantillon ;
- un test de cytotoxicité sur cellules Neuro-2a et/ou un test sur récepteur, lesquels présentent tous deux une meilleure spécificité et une plus grande sensibilité que le bio-essai sur souris ;
- une analyse par LC-MS/MS, afin de tenter de confirmer la présence de ciguatoxines connues en cas de résultats positifs par l'une des méthodes ci-dessus.

Les données ainsi produites pourraient ensuite être exploitées dans le cadre d'une évaluation des risques sanitaires pour le consommateur.

3.9 Commentaires du GT concernant les résultats d'analyse de requins tigre et bouledogue prélevés à La Réunion en 2012 et 2013

Afin d'acquérir des données de contamination par les ciguatoxines de deux espèces de requins, (le requin tigre *Galeocerdo cuvier* et le requin bouledogue *Carcharhinus leucas*), les services de la préfecture de La Réunion ont lancé une campagne de prélèvements en 2012 et 2013 portant sur 12 spécimens par espèce avec recherche de ciguatoxines par bio-essai sur souris. Cette campagne de prélèvements a été étendue en 2013 avec un objectif de 45 spécimens supplémentaires par espèce.

A ce jour, 24 spécimens (12 par espèce) ont fait l'objet d'analyses de ciguatoxines par bio-essai sur souris (tableau 6) et 5 d'entre eux ont également fait l'objet d'analyses de métaux lourds (plomb, cadmium, mercure). Les résultats de ces analyses ont été transmis à l'Anses dans le cadre de la saisine par la DGAL.

Tableau 6. Résultats des analyses de bio-essais sur souris pour la détection de ciguatoxines dans la chair de 24 spécimens de requins prélevés à La Réunion en 2012 et 2013 (méthode Anses Maisons-Alfort CAT 10 modifiée)

N° échantillon	Espèce	Date pêche	Longueur Totale (LT, cm)	Longueur Fourche (LF, cm)	Sexe	Ref ARVAM	Résultat
001-140812	<i>Galeocerdo cuvier</i>	15-août-12	310	251	M	13/15	Négatif
001-03112012	<i>Carcharhinus leucas</i>	1-nov-12	285	234	M	13/18	Négatif
001-15112012	<i>Galeocerdo cuvier</i>	15-nov-12	362	295	M	13/16	Négatif
002-15112012	<i>Galeocerdo cuvier</i>	15-nov-12	308	261	F	13/17	Négatif
001-22112012	<i>Galeocerdo cuvier</i>	22-nov-12	321	270	M	13/19	Négatif
002-22112012	<i>Galeocerdo cuvier</i>	22-nov-12	384	312	F	13/20	Négatif
001-13122012	<i>Galeocerdo cuvier</i>	13-déc-12	323	265	F	13/21	Négatif
002-13122012	<i>Galeocerdo cuvier</i>	13-déc-12	338	290	F	13/22	Négatif
003-13122012	<i>Galeocerdo cuvier</i>	13-déc-12	285	235	F	13/23	Négatif
004-13122012	<i>Galeocerdo cuvier</i>	13-déc-12	289	241	M	13/31	Négatif
001-03042013	<i>Galeocerdo cuvier</i>	3-avr-13	390	325	F	13/32	Négatif
001-23052013	<i>Galeocerdo cuvier</i>	23-mai-13	294	239	M	13/40	Négatif
002-23052013	<i>Galeocerdo cuvier</i>	23-mai-13	325	266	F	13/41	Négatif
001-06062013	<i>Carcharhinus leucas</i>	6-juin-13	285	241	F	13/33	Négatif
002-06062013	<i>Carcharhinus leucas</i>	6-juin-13	214	178	M	13/34	Négatif
003-06062013	<i>Carcharhinus leucas</i>	6-juin-13	220	187	M	13/35	Négatif
001-10062013	<i>Carcharhinus leucas</i>	10-juin-13	232	197	M	13/36	Négatif
001-11062013	<i>Carcharhinus leucas</i>	11-juin-13	231	190	F	13/37	Négatif
001-19062013	<i>Carcharhinus leucas</i>	19-juin-13	325	275	F	13/38	Négatif
001-27062013	<i>Carcharhinus leucas</i>	27-juin-13	273	221	M	13/39	Négatif
001-03072013	<i>Carcharhinus leucas</i>	3-juil-13	223	190	M	13/42	Négatif
001-05072013	<i>Carcharhinus leucas</i>	5-juil-13	308	258	F	13/43	Négatif
001-11072013	<i>Carcharhinus leucas</i>	11-juil-13	260	220	F	13/44	Négatif
001-18072013	<i>Carcharhinus leucas</i>	18-juil-13	317	267	F	13/45	Négatif

Remarque figurant dans le rapport d'analyse : Les symptômes connus des carchatoxines injectées à des souris sont : paralysie des membres, dyspnée, convulsions, diarrhées et mortalité par arrêt respiratoire en 4h, au-delà les animaux récupèrent (Boisier et al., 1995). Ces symptômes n'ont pas été observés pour les 24 échantillons testés. Cependant, certains signes atypiques (diarrhées brèves) ont été observés pour tous les échantillons de *Carcharhinus leucas* (non observé pour les échantillons de *Galeocerdo cuvier*). Cet effet pourrait être dû à la matrice. L'absence de matrice positive (interne ou commerciale) et la faible sensibilité du bio-essai sur souris ne permet pas d'affiner l'interprétation de ce point précis.

Au regard des éléments présentés précédemment dans le rapport, même si le bio-essai sur souris a fourni un résultat négatif pour les 24 échantillons de chair de requins analysés, il n'est pas possible de conclure avec certitude que ces échantillons ne sont pas contaminés par des toxines à des niveaux qui pourraient présenter un risque pour la santé du consommateur. En effet, ce test n'est pas suffisamment sensible pour détecter des concentrations de ciguatoxines considérées sans risque pour l'Homme.

Des analyses complémentaires par test de cytotoxicité sur cellules Neuro-2a et/ou un test sur récepteur, ainsi que par LC-MS/MS permettraient d'acquérir les données nécessaires.

L'Anses a donc engagé une convention de recherche et de développement (CRD) avec l'Arvam (Agence pour la recherche et la valorisation marines, La Réunion), en collaboration avec l'IRTA (Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentaria, Espagne) afin que les échantillons de chair de requins réunionnais soient analysés par test de cytotoxicité sur cellules Neuro-2a. Le rapport final a été transmis à l'Anses le 21 juillet 2014.

Les résultats n'ont pas montré la présence de toxines de type ciguatoxines au-delà de la limite de détection de $0,04 \mu\text{g eq P-CTX-1 kg}^{-1}$ de chair. Il convient de noter que cette limite de détection est supérieure à la concentration considérée sans risque pour l'Homme de $0,01 \mu\text{g eq. P-CTX-1 kg}^{-1}$ de chair de poisson (EFSA, 2010 ; US-FDA, 2011). Cette limite de détection élevée est principalement due à la matrice, ce type d'échantillon étant étudié pour la première fois dans le laboratoire.

La CRD incluait également des échantillons du requin impliqué dans un foyer d'intoxications survenu à Madagascar en novembre 2013 (124 personnes intoxiquées dont 9 sont décédées) afin qu'ils soient analysés par bio-essai sur souris et par test de cytotoxicité sur cellules Neuro-2a. L'analyse génétique a permis de conclure qu'il s'agissait d'un requin bouledogue. L'échantillon de chair a donné un résultat positif par bio-essai sur souris, avec des symptômes (prostration, dyspnée, cyanose, convulsions et mortalité par arrêt respiratoire) typiques de ceux connus pour les carchatoxines (Boisier et al., 1995). L'analyse d'un échantillon de chair, d'un échantillon d'estomac et de trois échantillons d'aileron séché par test de cytotoxicité sur cellules Neuro-2a a conclu à la présence de toxines de type ciguatoxines, dont les concentrations estimées sont les suivantes :

- chair : $0,144 \mu\text{g eq P-CTX-1 kg}^{-1}$ (soit 14 fois la limite la concentration considérée sans risque pour l'Homme) ;
- estomac : $114 \mu\text{g eq PCTX-1 kg}^{-1}$ (soit 11 400 fois la concentration considérée sans risque pour l'Homme) ;
- aileron séché : $0,145 \mu\text{g eq PCTX-1 kg}^{-1}$; $0,158 \mu\text{g eq PCTX-1 kg}^{-1}$; $0,737 \mu\text{g eq PCTX-1 kg}^{-1}$ (soit 14 à 74 fois la concentration considérée sans risque pour l'Homme).

3.10 Eléments d'éthologie des requins tigre et bouledogue dans les eaux réunionnaises

Rappel de la Question :

Dans le cas où l'Anses identifierait une méthode d'analyse des ciguatoxines dans la chair de requins suffisamment fiable, quelles données seraient nécessaires pour mener cette évaluation et quelles recommandations pourraient être émises concernant le protocole de prélèvement du requin tigre et du requin bouledogue à La Réunion? Il sera notamment pris en compte la zone géographique concernée et l'éthologie de ces deux espèces de requins en termes de capacité de déplacements dans les eaux marines réunionnaises.

Synthèse des résultats préliminaires des marquages acoustiques des requins tigre et bouledogue, à partir des données obtenues de décembre 2011 à septembre 2013, dans le cadre du programme CHARC

Le programme CHARC (Connaissances de l'écologie et de l'Habitat de deux espèces de Requins Côtiers sur la côte Ouest de La Réunion) a pour but de collecter des informations sur le comportement des individus marqués pour définir les différents habitats des requins bouledogue et tigre à partir de leur temps de présence et de leurs déplacements dans cette zone. En collaboration avec le CRESSM (Comité Régional d'Etudes et de Sports Sous-Marins), 3 pêcheurs de la côte ouest de l'île, l'association Squal'idées et les équipes de plongeurs et de marquage, l'équipe scientifique de l'IRD a effectué le déploiement de 49 stations d'écoute et le marquage avec des marques codées de 81 requins, 39 requins bouledogue et 42 requins tigre. La zone d'étude s'étend actuellement du Port jusqu'à la ville de Saint-Pierre avec deux stations supplémentaires aux sorties des ports de Sainte-Marie et de Sainte-Rose.

A ces observations comportementales s'ajoutent deux études concernant l'écologie trophique des requins étudiés et la génétique des populations à l'échelle de l'océan Indien occidental. L'étude de l'écologie trophique a pour but de caractériser le régime alimentaire par des analyses des contenus stomacaux et d'identifier *i*) les sources de production dont les individus ou/et les espèces dépendent et *ii*) l'habitat dans lequel ils s'alimentent de façon régulière. Cette identification s'effectue à partir de l'analyse comparative des isotopes du carbone, de l'azote et du soufre et des métaux lourds, contenus dans les échantillons prélevés dans le milieu (eau, sédiment et proies) et sur les requins (muscle et sang). L'étude de génétique des populations des espèces de requins ciblées permet d'apporter des informations sur la diversité génétique des populations (régime de reproduction, consanguinité) et sur la différenciation des populations (flux de gène, dispersion efficace au sein de l'océan Indien). A ce jour, peu d'échantillons ont pu être recueillis.

3.10.1 Le requin tigre (*Galeocerdo cuvier*)

Les premiers résultats concernant le requin tigre montrent que les temps de présence dans la zone d'étude sont très faibles (ils représentent 2% du jeu de données). Les requins marqués ont été détectés sur trois DCPs (dispositifs de concentration de poissons) plus au large, ce qui représente 26% du temps total de présence de ces requins dans le réseau de stations. Ces résultats montrent que le requin tigre se déplace à La Réunion dans un habitat plus au large que celui, très côtier, suivi par la majorité des stations d'écoute.

Il convient de noter le cas d'un requin tigre femelle sub-adulte de 3 mètres de longueur totale, marqué à La Réunion le 6 décembre 2012 sur le tombant du sec de Saint-Paul à 3 km de la côte, qui a été pêché 9 mois plus tard le 28 août 2013 à Morombé sur la côte ouest de Madagascar à une centaine de kilomètres au Nord de Tuléar. Cet individu a donc parcouru en environ 9 mois au moins **1800 km** en traversant la partie Sud-Ouest de l'océan Indien entre les deux îles. **Ce résultat suggère que le requin tigre occupe une aire biogéographique très vaste, à l'échelle de l'océan Indien.**

Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature sur l'occupation spatiale des requins tigre et leur capacité à effectuer des déplacements sur de longues distances (Heithaus et al., 2002 ; Meyer et al., 2009). Ainsi, dans un programme similaire, Werry et al. (2014) ont observé

les déplacements de 33 requins tigrés marqués dans la zone ouest-pacifique (entre la Nouvelle Calédonie et l'Australie) entre 2009 et 2013. Une grande diversité a été observée dans les profils de déplacement, certains (14 d'entre eux) parcourant jusqu'à 1141 km tandis que d'autres (surtout les jeunes mais aussi un adulte) semblent plus fidèles à une zone donnée.

Les requins tigrés de La Réunion feraient donc partie d'une population ouverte à l'échelle de l'océan Indien (interagissant avec les autres populations de requins de la même espèce).

L'étude des contenus stomacaux des requins tigrés a mis en évidence un taux élevé d'estomacs dévaginés ou vides (58%). Les estomacs non vides ont montré une grande diversité de proies. Le requin tigré consomme des oiseaux marins, des céphalopodes et des crustacés mais il est piscivore dominant, ce qui correspond à la littérature. Les valeurs isotopiques mesurées montrent que le requin tigré dépend essentiellement de sources de production côtière. Les valeurs d'azote ne diffèrent pas significativement de celles des carangues (*Caranx ignobilis*), des dorades (*Coryphaena hippurus*), des thons jaunes (*Thunnus albacares*), des bonites (*Katsuwonus pelamis*) et des dauphins côtiers (*Stellena longirostris* et *Tursiops aduncus*), ce qui indique que ces espèces ont des positions trophiques similaires et qu'elles consomment des proies de même niveau trophique. Ces espèces sont donc potentiellement en compétition avec les requins tigrés, bien que les thons jaunes et bonites consomment plus de crustacés comparés aux autres espèces. Les poissons profonds ont des valeurs en azote supérieures à celles des requins tigrés. Compte tenu de la petite taille de ces espèces par rapport aux requins, il semble plus vraisemblable que ces espèces vivent dans des masses d'eau dont les lignes de base en azote sont plus élevées que les eaux de surface. Ce résultat indique que les requins tigrés ne s'alimentent pas de façon régulière et importante en profondeur, mais dans les eaux de surface (< 150 m) ce qui est corroboré par les enregistrements des profils verticaux obtenus sur quelques requins marqués. Il paraît donc vraisemblable que les requins tigrés s'alimentent sur des poissons de petite taille, au niveau des tombants du sec de St Paul/St Gilles.

L'analyse des éléments traces n'a pas mis en évidence de relation prédateurs-proies claire. Les valeurs mesurées dans les sédiments ne permettent pas de discriminer les différentes stations le long de la côte ouest de l'île et ne permettent pas non plus d'identifier des habitats d'alimentation préférentiels pour les requins tigrés.

3.10.2 Le requin bouledogue (*Carcharhinus leucas*)

Les premiers résultats concernant le requin bouledogue montrent qu'ils ne sont pas présents de façon permanente sur la zone d'étude à La Réunion. Ils peuvent, pour la plupart, explorer les 80 km de côtes où le réseau de stations d'écoute est déployé et pour certains explorer toute l'île et au-delà. Leur présence très près de la côte est généralement éphémère, sporadique et le plus souvent nocturne. Elle est plus forte en fin d'après-midi (15h-17h) et à la tombée de la nuit. Ils sont davantage présents en hiver qu'en été mais sur quelques sites, essentiellement au cours des périodes de transition (hiver-été ou été-hiver). Leur présence est principalement constatée sur trois sites du littoral Ouest : baie de St Paul, large de St Gilles et Etang du Gol et sur le site de Sainte-Marie au Nord. Leur plus forte présence en hiver le long des côtes pourrait être liée soit à des comportements de recherche et de sélection de nourriture soit à des comportements de reproduction. Le faible nombre de détections et le comportement de ces animaux n'indiquent pas une surabondance d'individus mais une occupation de l'habitat variable en fonction des conditions environnementales favorables ou défavorables qu'ils rencontrent. Plus que le nombre de requins présents, ce serait le mode d'occupation du milieu et les contraintes environnementales qui conduiraient certains requins bouledogue à occuper la frange du littoral. Les conditions environnementales favorables à la présence du requin bouledogue sont en partie connues : la forte turbidité, la présence d'eaux saumâtres et des eaux chargées en matières organiques. D'autres facteurs, tels que la température, la houle ou la quantité de proies, sont examinés dans le cadre du programme CHARC. Les données concernant ces facteurs ont été recueillies et leur analyse est en cours.

Concernant l'étude des déplacements du requin bouledogue, un requin mâle d'environ 3 mètres de longueur totale a été suivi dans ses déplacements à grande échelle pendant 6 mois par une marque satellite externe (mini-PAT, Wildlife Computer) fixée à la base arrière du premier aileron

dorsal. Les résultats de l'analyse indiquent que ce requin aurait quitté La Réunion peu après son marquage pour explorer une zone à environ 300 km au Sud Sud-Ouest de La Réunion, non loin d'un haut-fond connu des pêcheurs hauturiers, puis serait revenu vers l'île dans une zone plus proche (à environ 100 km toujours au Sud Sud-Ouest de La Réunion) pour repartir plus au Nord à environ 300 km de l'île, non loin d'un autre haut-fond également connu des pêcheurs. Enfin, il serait revenu sur les côtes de l'île en fin de période d'observation (figure 8). Cet individu semble donc capable d'effectuer de longs déplacements dans le milieu océanique et de séjourner loin des côtes. Ce résultat avait déjà été obtenu lors d'une expérience similaire sur les requins bouledogue des îles Fidji en 2004 (Brunnschweiler et al., 2010). Cette espèce serait ainsi capable de visiter le milieu pélagique et de nager en pleine eau dans des zones très profondes. La profondeur des fonds marins ne serait pas une barrière à ses déplacements. Le requin bouledogue serait ainsi capable de quitter l'île et d'y revenir.

L'étude des contenus stomacaux des requins bouledogue a mis en évidence un taux élevé d'estomacs dévaginés ou vides (46%). Les estomacs non vides ont montré une faible diversité de proies. Le requin bouledogue est piscivore dominant et se concentre sur les poissons de grande taille (> 30 cm) ce qui correspond à la littérature. Les résultats des valeurs isotopiques et d'éléments traces des bouledogues et d'autres proies ne sont pas encore disponibles.

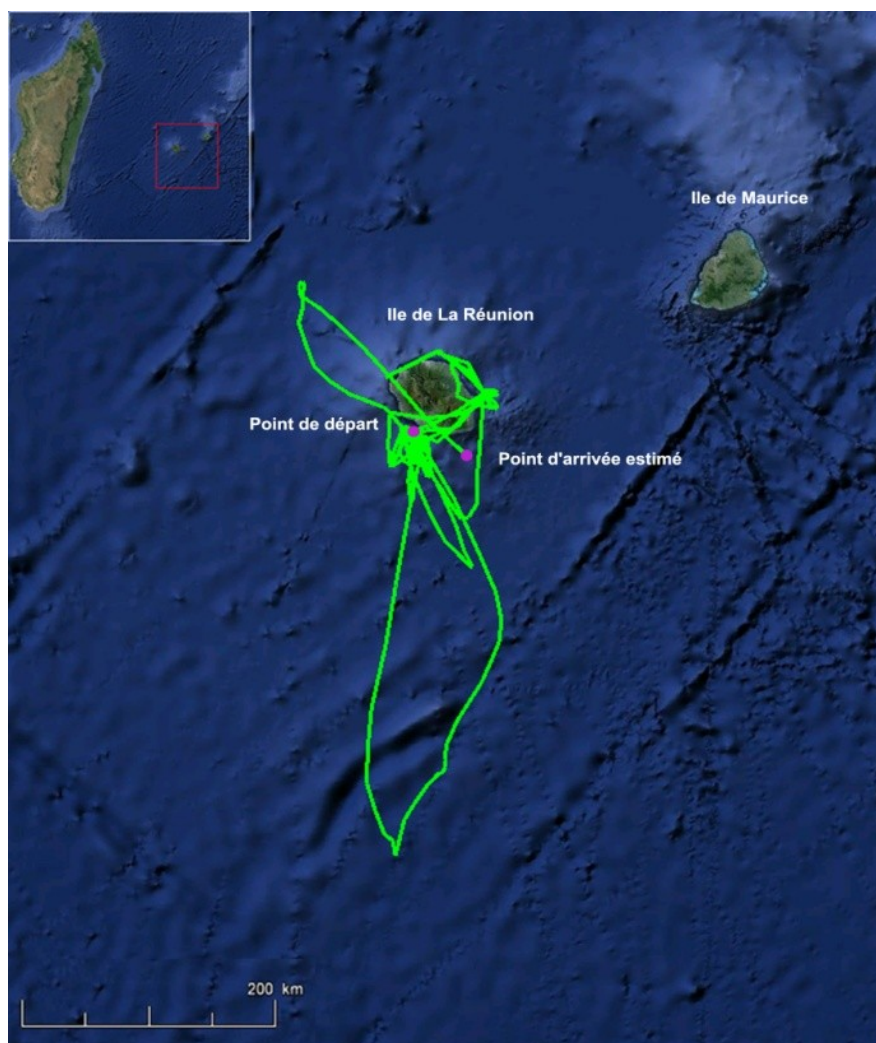


Figure 8 : Trajectoire estimée d'un requin bouledogue mâle entre le 15 mars et le 6 septembre à partir des mesures d'éclairement obtenues par le capteur de la marque miniPAT fixée sur l'aileron du requin. (NB : les trajets sur terre sont évidemment impossibles et uniquement dus à l'imprécision de la mesure.)

3.10.3 Synthèse et perspectives

Afin de spécifier les données écologiques qui seraient nécessaires pour suivre la dynamique de bioaccumulation des ciguatoxines (ou des carchatoxines) dans la chaîne alimentaire, il est important de distinguer plusieurs sources de variabilité selon que l'on se place à l'échelle de l'individu ou de la population.

A l'échelle de l'individu, le niveau de contamination dépend notamment du comportement alimentaire des requins. Les requins sont des prédateurs apicaux (prédateurs en fin de chaîne alimentaire) et peuvent donc être fortement contaminés du fait du processus de bioaccumulation (Rand et al., 1995). Les requins tigre et bouledogue sont des espèces opportunistes, capables de coloniser un éventail d'habitats très large et généralistes, de se nourrir de différentes espèces mais ils peuvent aussi se nourrir exclusivement d'une espèce tant que celle-ci est en abondance (Stevens et al., 1991 ; Snelson et al., 1995). Plus spécifiquement, les requins tigre et bouledogue à La Réunion sont essentiellement piscivores et d'après les premiers résultats du programme CHARC, ils cibleraient davantage les poissons côtiers que les poissons pélagiques ou de grands fonds. Ces données devront être affinées mais dès lors que l'origine et la localisation des sources de contamination seront connues, ils permettront de mieux comprendre les variabilités observées dans les processus de bioaccumulation et de contamination à l'échelle des individus.

A l'échelle de la population, le niveau de contamination dépend du nombre et de la localisation des foyers de contamination, de la taille et de la structure des populations des deux espèces de requins ciblées (degré de connectivité entre populations ou sous-populations de requins de l'océan Indien, fragmentation de l'habitat des espèces, taux d'échange entre ces populations). A ce jour, les premiers résultats du programme CHARC ont montré que le requin tigre effectue des déplacements océaniques et que le requin bouledogue est capable de visiter les eaux océaniques à plusieurs kilomètres de La Réunion. **Les tailles des populations à La Réunion sont inconnues et difficilement estimables** car les données de pêche sont insuffisantes. Le taux de déplacement sur de longues distances et l'importance de ce taux dans le turn-over des populations locales à La Réunion et sur les autres zones où la présence des requins a été notée (Madagascar, Afrique du Sud et Seychelles notamment) sont inconnus. Ce taux peut être très faible si les événements observés dans le programme CHARC (pêche à Madagascar d'un requin tigre marqué à La Réunion, déplacement à plusieurs kilomètres de l'île d'un requin bouledogue marqué) sont rares et ont eu la chance d'être observés. Les causes de ses déplacements (alimentaires ou de reproduction) sont également inconnues. Le requin tigre pêché à Madagascar l'a été dans une zone d'estuaire assez importante, zone de nurserie connue pour cette espèce. Cette femelle est-elle partie mettre bas dans cette zone ou trouver des conditions d'alimentation favorables ? Le requin bouledogue mâle en quittant l'île s'est rapproché de zones de haut-fond connus par les pêcheurs pour leur plus forte productivité halieutique. Est-ce que ce requin a pu suivre un chemin migratoire lui permettant de retrouver ces sites d'alimentation ou ce rapprochement est-il fortuit ?

D'autres données de marquage seront encore nécessaires pour répondre à ces questions. Les données issues d'autres pays du pourtour de l'océan Indien permettront d'en savoir davantage sur les caractéristiques de déplacement de ces espèces. Une étude ciblée sur la biologie de ces espèces et notamment sur la génétique des populations des requins tigre et bouledogue à l'échelle de l'océan Indien occidental est également une perspective de recherche prometteuse. Les données recueillies essentiellement à La Réunion sont pour le moment insuffisantes mais un programme de plus grande ampleur à l'échelle de l'océan Indien permettrait d'apporter des informations sur les lieux et périodes de ponte et de reproduction et sur la diversité génétique des populations (régime de reproduction, consanguinité) et la différenciation des populations (flux de gène, dispersion efficace au sein de l'océan Indien). L'analyse de parenté sur les échantillons de La Réunion permettra de définir les liens entre individus : présence de père/mère, frère/sœur, demi-frère/ demi-sœur, d'identifier des comportements grégaires et d'étudier la philopatrie (tendance de certains individus à rester ou à revenir à l'endroit où ils sont nés). Il serait possible alors d'en déduire le comportement de fidélité de ces espèces à certains sites de reproduction, ce qui pourra apporter des informations cruciales pour la détermination de l'échelle spatiale à laquelle les stratégies d'échantillonnage doivent être mise en place.

Concernant ces stratégies d'échantillonnage et notamment le protocole de prélèvement des requins tigre et bouledogue à La Réunion, il serait possible, sachant le pourcentage d'individus de la population totale qui sont contaminés et le nombre d'individus qui composent la population totale, d'estimer, à partir de lois de probabilité (telles que la loi hypergéométrique), le nombre d'individus qu'il faudrait prélever pour avoir une bonne ou très bonne probabilité de capturer au moins un individu contaminé par des ciguatoxines (ou des toxines similaires).

A ce jour, en l'absence d'estimation de la population de requins tigre et bouledogue dans les eaux réunionnaises, il n'est pas possible d'émettre des recommandations pour un protocole de prélèvement de requins permettant de statuer sur les risques liés à une éventuelle autorisation de ces espèces pour la consommation humaine, au regard du risque ciguatérique.

4 Perspectives – besoins de recherche

Dans le strict cadre des questions posées par la saisine, le GT a identifié des besoins de recherche portant sur :

- 1) la mise au point d'outils de diagnostic de la présence de CTXs (ou de toxines similaires, telles que les carchatoxines) dans les requins et d'un plan d'action en cas d'intoxication par la consommation de requins, cela implique de :
 - ▶ définir des protocoles de récupération d'échantillons (par exemple, des restes de repas, des poissons prélevés dans la même zone) et de toute autre information utile pour l'étude des toxines dans les tissus de requin responsables d'intoxications alimentaires dans la zone de l'océan Indien ;
 - ▶ mettre en place un réseau de laboratoires et une coordination, afin de répondre rapidement en cas d'intoxications alimentaires collectives de type ciguatérique ;
 - ▶ développer des méthodes fiables d'identification et de quantification des toxines de type CTXs dans les différents tissus du requin :
 - optimiser les protocoles d'extraction ;
 - identifier la combinaison optimale de méthodes parmi le bio-essai sur souris, le test Neuro-2a, le RBA et l'analyse LC-MS/MS ;
 - établir les limites de quantification du bio-essai sur souris, du test Neuro-2a, du test RBA ;
 - en cas de présence dans les requins de toxines autres que les CTXs (carchatoxines ou autres toxines), développer les protocoles de purification et de détection propres à ces toxines.
 - ▶ obtenir des échantillons de référence avec des I-CTXs, C-CTXs, P-CTXs et le cas échéant de carchatoxines (différents poissons/requins comme source), outils nécessaires pour le réseau de laboratoire et pour l'identification des toxines (cf. points suivants) ;
 - ▶ lancer un programme de validation de méthodes et d'exercices interlaboratoires.
- 2) l'identification des I-CTXs ou de toxines similaires (carchatoxines) dans les requins de l'océan Indien, cela implique de :
 - ▶ mettre en place un plan de collecte d'échantillons de requins ;
 - ▶ caractériser et quantifier les I-CTXs ou toxines similaires (carchatoxines) de ces populations spécifiques de requins ;
 - ▶ isoler des fractions toxiques (par exemple par fractionnement bioguidé) et purifier ces fractions pour identifier les toxines ; la spectrométrie de masse haute résolution pourrait apporter un plus dans ces études ;
 - ▶ étudier la répartition de ces toxines dans les différents tissus de requins (chair, foie).
- 3) l'étude de la toxicité des I-CTXs ou de toxines similaires (carchatoxines) :
 - ▶ étudier la toxicité aiguë des I-CTXs ou toxines similaires (carchatoxines) purifiées par voie intrapéritonéale et par voie orale chez la souris ;
 - ▶ étudier leur biodisponibilité, leur distribution tissulaire et leur métabolisme chez la souris.

4) l'origine et le transfert des I-CTXs ou toxines similaires (carchatoxines) chez les requins :

- ▶ mener des études écologiques de la distribution et des déplacements des requins :
 - au niveau individuel, pour mieux comprendre le comportement alimentaire des requins et l'origine de la contamination par les ciguatoxines ou des toxines similaires (carchatoxines) ;
 - au niveau populationnel, pour acquérir des informations sur la taille et la structure des populations des deux espèces de requins ciblées à l'échelle de l'océan Indien, le taux de déplacement des populations locales à La Réunion et sur les autres zones où la présence des requins a été notée (Madagascar, Afrique du Sud et Seychelles notamment). En ce sens, une étude ciblée sur la génétique des populations de requins tigre et bouledogue à l'échelle de l'océan Indien occidental est une perspective de recherche prometteuse. L'analyse de parenté sur les échantillons de La Réunion permettra de définir les liens entre individus, d'identifier des comportements grégaires et d'étudier la philopatrie (tendance de certains individus à rester ou à revenir à l'endroit où ils sont nés) ;
- ▶ étudier la relation taille/poids, les conditions physiologiques et la position dans la chaîne trophiques des espèces de requins responsables d'intoxications alimentaires, mais aussi des autres espèces pisciaires ;
- ▶ identifier les microalgues/cyanobactéries à l'origine de la production de I-CTXs ou d'autres toxines identifiées dans les tissus analysés et dans les zones prospectées, notamment acquérir plus de connaissances sur des espèces de *Gambierdiscus* spp. endémiques des eaux réunionnaises et des profils toxiques qui les caractérisent.

5 Conclusions du groupe de travail

L'analyse de la littérature scientifique et plus largement une recherche sur internet ont permis d'identifier et de décrire des cas d'intoxications alimentaires associées à la consommation de requins (viande et/ou foie) du XIX^{ème} siècle à nos jours. Des cas, parfois mortels, ont ainsi été rapportés en Nouvelle Calédonie, dans les îles Cook, les îles Gilbert, en Polynésie Française, à Madagascar (notamment en novembre 2013 et février 2014) et à La Réunion (en 1993). Le requin tigre était l'espèce mise en cause dans les îles Gilbert. Par ailleurs, cette espèce a été décrite comme « ciguatérique » par Bagnis (1981), sur la base de données recueillies dans les îles Samoa, Fiji et Mascareignes (Les Mascareignes sont un archipel de l'océan Indien formé de trois îles principales, La Réunion, Maurice et Rodrigues, ainsi que plusieurs petites îles proches). A Madagascar, le requin tigre a été associé à au moins un cas d'intoxication alimentaire et le requin bouledogue à deux cas (Champetier de Ribes et al., 1998). L'analyse génétique du requin impliqué dans l'intoxication alimentaire survenue en novembre 2013 a permis de conclure qu'il s'agissait d'un requin bouledogue.

Les symptômes observés lors de ces intoxications alimentaires associées à la consommation de requins correspondent aux symptômes caractéristiques des ciguatoxines. Toutefois, certains auteurs suggèrent qu'il s'agirait en fait d'autres toxines ayant des propriétés similaires, dénommées carchatoxines, mais dont la structure n'a pas été caractérisée à ce jour. Plus de 175 symptômes différents ont été recensés en phase aiguë et chronique de la ciguatera (nom donné à l'intoxication par les ciguatoxines). Des différences régionales ont été notées et peuvent être attribuées à la présence de ciguatoxines différentes. Ainsi, on distingue les ciguatoxines du Pacifique (P-CTXs), des Caraïbes (C-CTXs) et de l'océan Indien (I-CTXs). Il n'est pas exclu que les carchatoxines puissent être de nouveaux analogues de ciguatoxines, par exemple des formes très oxydées.

D'autres données concernant la contamination de requins (chair ou foie), en particulier des requins tigre et bouledogue, par des ciguatoxines (ou des toxines similaires) ont été collectées et analysées. Il s'agit d'études réalisées dans les années 1960 à 1980, à l'aide du bio-essai sur mangouste.

→ Sur la base de ces éléments, le CES ERCA estime qu'il convient de prendre en compte non seulement les ciguatoxines mais aussi un autre type de toxines, spécifiques de certains requins, et dénommées jusqu'à présent carchatoxines.

Les méthodes analytiques actuellement applicables à la détection et à la quantification de ciguatoxines dans la chair de requin ont été recensées et décrites. Ces méthodes comprennent : les essais sur animaux en particulier le bio-essai sur souris, le test sur cellules de neuroblastomes Neuro-2a, le test radioligand-récepteur, les tests immunologiques et les méthodes physico-chimiques notamment la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).

→ Après avoir considéré les points forts et les faiblesses des méthodes analytiques disponibles au regard de la complexité et de la diversité des toxines qui composent la famille des ciguatoxines (P-CTXs, C-CTXs et I-CTXs), le GT recommande d'employer une combinaison des techniques suivantes :

- un bio-essai sur souris, afin de rechercher s'il y a une toxicité globale dans l'échantillon ;
- un test de cytotoxicité sur cellules Neuro-2a et/ou un test sur récepteur, lesquels présentent une meilleure spécificité et une plus grande sensibilité que le bio-essai sur souris ;
- une analyse par LC-MS/MS, afin de tenter de confirmer la présence de ciguatoxines connues en cas de résultats positifs par l'une des méthodes ci-dessus.

Les données ainsi produites pourraient ensuite être exploitées dans le cadre d'une évaluation des risques sanitaires pour le consommateur.

Considérant ces recommandations, la seule analyse par bio-essai sur souris de 24 échantillons de requin réunionnais (les échantillons ayant tous donné un résultat négatif par bio-essai sur souris) transmis à l'Anses dans le cadre de cette expertise ne permet pas de produire des résultats suffisants pour conclure à leur salubrité quant à la présence de ciguatoxines.

L'Anses a donc engagé une convention de recherche et de développement (CRD) avec l'Arvam (en collaboration avec l'IRTA) afin que ces échantillons soient analysés par test de cytotoxicité sur cellules Neuro-2a. Le rapport final a été transmis à l'Anses le 21 juillet 2014.

Les résultats n'ont pas montré la présence de toxines de type ciguatoxines au-delà de la limite de détection de $0,04 \mu\text{g eq P-CTX-1 kg}^{-1}$ de chair. Il convient de noter que cette limite de détection est supérieure à la concentration considérée sans risque pour l'Homme de $0,01 \mu\text{g eq. P-CTX-1 kg}^{-1}$ de chair de poisson.

La CRD incluait également des échantillons du requin bouledogue impliqué dans un foyer d'intoxications survenu à Madagascar en novembre 2013 (124 personnes intoxiquées dont 9 sont décédées) afin qu'ils soient analysés par bio-essai sur souris et par test de cytotoxicité sur cellules Neuro-2a. L'échantillon de chair a donné un résultat positif par bio-essai sur souris, avec des symptômes (prostration, dyspnée, cyanose, convulsions et mortalité par arrêt respiratoire) typiques de ceux connus pour les carchatoxines (Boisier et al., 1995). L'analyse d'un échantillon de chair, d'un échantillon d'estomac et de trois échantillons d'aileron séché par test de cytotoxicité sur cellules Neuro-2a a conclu à la présence de toxines de type ciguatoxines, dont les concentrations estimées sont les suivantes :

- chair : $0,144 \mu\text{g eq P-CTX-1 kg}^{-1}$ (soit 14 fois la limite la concentration considérée sans risque pour l'Homme) ;
- estomac : $114 \mu\text{g eq PCTX-1 kg}^{-1}$ (soit 11 400 fois la concentration considérée sans risque pour l'Homme) ;
- aileron séché : $0,145 \mu\text{g eq PCTX-1 kg}^{-1}$; $0,158 \mu\text{g eq PCTX-1 kg}^{-1}$; $0,737 \mu\text{g eq PCTX-1 kg}^{-1}$ (soit 14 à 74 fois la concentration considérée sans risque pour l'Homme).

Des éléments d'éthologie relatifs aux requins tigre et bouledogue dans les eaux réunionnaises ont été recueillis et décrits de manière synthétique. Ces requins sont des prédateurs apicaux piscivores capables de se nourrir de différentes espèces. Ils présentent à La Réunion une fidélité restreinte à certains sites mais sont capables de coloniser un éventail très large d'habitats différents et de se déplacer sur de longues distances, notamment jusqu'à Madagascar, où des intoxications alimentaires associées à la consommation de requin ont été récemment rapportées (novembre 2013 et février 2014). Il serait donc particulièrement intéressant de savoir si les requins effectuent également des déplacements de Madagascar vers La Réunion. On ne connaît aujourd'hui ni l'origine ni la dynamique de bioaccumulation de ces toxines chez les requins. De plus, les connaissances des traits de vie de ces deux espèces de requins et la dynamique de leurs populations sont très partielles et insuffisantes. Des résultats ont été obtenus et des méthodes d'analyse proposées (programme CHARC). Néanmoins, les lacunes citées concernant l'écologie des requins devront être comblées pour que ces acquis puissent être exploités et servir de base à la mise en place d'un plan de surveillance permettant de statuer sur les risques liés à une éventuelle autorisation de ces espèces pour la consommation humaine, au regard du risque ciguatérique.

Dans le strict cadre des questions posées par la saisine, le GT a identifié des besoins de recherche portant sur :

- la mise au point d'outils de diagnostic de la présence de CTXs (ou de toxines similaires, telles que les carchatoxines) dans les requins et d'un plan d'action en cas d'intoxication par consommation de requins ;

- l'identification des analogues de ciguatoxines ou de toxines similaires (carchatoxines) dans les requins de l'océan Indien ;
- la toxicité de ces toxines, leur origine et leur transfert chez les requins ;
- la taille et la structure des populations de requins de l'océan Indien ainsi que leurs déplacements et les distances parcourues.

Date de validation du rapport d'expertise collective par le groupe de travail : le 25 juillet 2014

6 Bibliographie

6.1 Publications

► Toxicité des ciguatoxines et mode d'action

Bagnis R, Spiegel A, Nguyen L, Plichart R (1992). Public Health, Epidemiologists of Ciguatera in Tahiti. Pp. 157-168 in "Proceedings of the 3rd International Conference CIGUATERA, Puerto Rico, 1990, Editor T.R. Tosteson. Polyscience Publications, Quebec, Canada. ISBN 0-921317-35-2.

Chinain M, Gatti C, Darius T (2013). Ciguatera : aspects physiologiques et cliniques. Bulletin de veille sanitaire Cire Antilles Guyane n°3, avril 2013, pages 2-6.

EFSA (European Food Safety Authority), Panel on Contaminants in the Food Chain (2010). Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Emerging toxins: Ciguatoxin group. EFSA Journal 2010; 8(6): 1627-, 38 pp.

Hamilton B, Hurbungs M, Vernoux JP, Jones A, Lewis RJ (2002). Isolation and characterisation of Indian Ocean ciguatoxin. Toxicon 40, 685-693.

Hossen V, Velge P, Turquet J, Chinain M, Larent D, Krysz S (2013). La ciguatera : un état des lieux en France et dans l'Union européenne. Bulletin épidémiologique santé animale – alimentation n°56, mars 2013, pages 3-9.

Kerbrat AS, Darius HT, Pauillac S, Chinain M, Laurent D (2010). Detection of ciguatoxin-like and paralyzing toxins in *Trichodesmium spp.* from New Caledonia lagoon. Marine Pollution Bulletin 61(7-12), 360-366.

Laurent D, Kerbrat AS, Darius HT, Girard E, Golubic S, Benoit E, Sauviat MP, Chinain M, Molgo J, Pauillac S (2008). Are cyanobacteria involved in Ciguatera Fish Poisoning-like outbreaks in New Caledonia? Harmful Algae 7(6), 827-838.

Lawrence DN, Enriquez MB, Lumish RM, Maceo A (1980). Ciguatera fish poisoning in Miami. J Am. Med. Assoc. 244(3): 254-258.

Lehane L (1999). Ciguatera Fish Poisoning: a review in a risk-assessment framework. Report B004936, National Office of Animal and Plant Health, Agriculture, Fisheries and Forestry – Australia, Canberra.

Pottier I, Vernoux JP, Lewis RJ (2001). Ciguatera fish poisoning in the Caribbean Islands and Western Atlantic Rev Environ Contam Toxicol 168, 99-141.

Quod JP and Turquet J (1996). Ciguatera in Réunion Island (SW Indian ocean) : epidemiology and clinical patterns. Toxicon 34(7), 779-785.

► Intoxications humains par les requins, contamination des requins par des ciguatoxines (ou des toxines ayant des propriétés similaires)

Bagnis R (1981). L'ichtyosarcotisme de type ciguatera : phénomène complexe de biologie marine et humaine. Oceanologica acta 4(3), 375-388.

Boisier P, Ranaivoson G, Rasolofonirina N, Andriamahefazafy B, Roux J, Chanteau S, Satake M, Yasumoto T (1995). Fatal mass poisoning in Madagascar following ingestion of a shark (*Carcharhinus leucas*): clinical and epidemiological aspects and isolation of toxins. Toxicon 33, 1359-1364.

Brock VE, Van Heukelem W, Helfrish P (1966). An ecological reconnaissance of Johnston Island and the effects of dredging. Technical report N°11, University of Hawai, Hawai Institute of Marine Biology, 60pp.

Champetier de Ribes G, Ranaivoson G, Ravaonindrina N, Rakotonjanabelo AL, Rasolofonirina N, Roux J, Yasumoto T (1998). Un problème de santé réémergent à Madagascar : les intoxications collectives par consommation d'animaux marins. Aspects épidémiologiques, cliniques et toxicologiques des épisodes notifiés de janvier 1993 à janvier 1998. Arch Inst Pasteur Madagascar 64 (1&2), 71-76.

Champetier de Ribes G, Ramarokoto S, Rabearintsoa S, Robinson R, Ranaivoson G, Rakotonjanabelo AL, Rabenson D (1999). Intoxications par consommation d'animaux marins à Madagascar 1999. Cahier Santé 9, 235-241.

Cooper MJ (1964). Ciguatera and other marine poisoning in the Gilbert Islands. Pacific Science 18(4): 411-440. <http://scholarspace.manoa.hawaii.edu/bitstream/handle/10125/7153/vol18n4-411-440.pdf?sequence=1>

Gatti C, Oelher E, Legrand AM (2008). Severe seafood poisoning in French Polynesia: A retrospective analysis of 129 medical files. Toxicon 51, 746-753.

Glaziou P and Legrand A.M. (1994). Review Article: The epidemiology of ciguatera fish poisoning. Toxicon 32(8), 863-873.

Halslead BW (1978). Poisonous and venomous marine animals of the world. Revised edition, the Darwin Press Inc. edition, Princeton, New Jersey. 1043 pp.

Habermehl GG, Krebs HC, Rasoanaivo P, Ramialiharisoa A (1994). Severe ciguatera poisoning in Madagascar: A case report. Toxicon 32(12), 1539-1542.

Le Bouquin V, D'Hooghe G, Quod JP, Marasse C (1993). « Ciguatera » une forme particulière à la Réunion. La presse Médicale 22, 1061.

Quod JP, Ten-Hage L, Molgo J, Benoit E, Turquet J, Bourdeau P (2001). La singularité des phycotoxines par rapport aux autres toxines marines, In: *Toxines d'algues dans l'alimentation*, JM Frémy & P Lassus coordinateurs, Edition Ifremer, p231-247.

Randall JE (1980). A survey of ciguatera at Enewetak and Bikini, Marshall Island, with notes on the systemics and food habits of ciguatoxic fishes. Fishery Bulletin 78(2), 201-249.

Rongo T and van Woesik R (2011). Ciguatera poisoning in Rarotonga, southern Cook Islands. Harmful Algae 10, 345-355.

Turquet J, Quod JP, Pannetier S, Ramialiharisoa A, Ranaivoson G, Hurbungs M, Jeannoda V (2000) Manuel méthodologique. Suivi et prévention des intoxications par consommation d'animaux marins dans le sud-ouest de l'océan Indien. Réalisé par ARVAM pour le compte de Commission de l'océan Indien, ISBN 99903-71-01-6, 50 pp.

Yasumoto T (1998). Fish poisoning due to toxins of microalgal origins in the Pacific. Toxicon 36, 1515-1518.

► Méthodes d'essais et d'analyse

Chimie des ciguatoxines

Boisier P, Ranaivoson G, Rasolofonirina N, Andriamahefazafy B, Roux J, Chanteau S, Satake M, Yasumoto T (1995). Fatal mass poisoning in Madagascar following ingestion of a shark (*Carcharhinus leucas*): clinical and epidemiological aspects and isolation of toxins. Toxicon 33, 1359-1364.

Caillaud A, de la Iglesia P, Darius T, Pauillac S, Aligizaki K, Fraga S, Chinain M, Diogène J (2010). Update on the methodologies available for ciguatoxin determination: perspectives to confront the onset of ciguatera fish poisoning in Europe. Mar Drug 8, 1838-1907.

Chinain M, Darius HT, Ung A, Cruchet P, Wang Z, Ponton D, Laurent D, Pauillac S (2010). Growth and toxin production in the ciguatera-causing dinoflagellate *Gambierdiscus polynesiensis* (Dinophyceae) in culture. Toxicon 56, 739-750.

EFSA (European Food Safety Authority), Panel on Contaminants in the Food Chain (2010). Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Emerging toxins: Ciguatoxin group. EFSA Journal 2010; 8(6): 1627-, 38 pp.

Hamilton B, Hurbungs M, Vernoux JP, Jones A, Lewis RJ (2002). Isolation and characterisation of Indian Ocean ciguatoxin. *Toxicon* 40, 685-693.

Lenoir S (2006). Complexes neurotoxiques impliqués dans la contamination des produits de la mer de l'océan Indien : caractérisation toxinique et contribution des toxines de *Gambierdiscus toxicus* et *Ostreopsis mascarenensis*. Thèse de doctorat du MNHN, spécialité Ecotoxicologie Marine, Paris, 321 pp + annexes.

Lewis RJ, Vernoux JP, Brereton IM (1998). Structure of Caribbean ciguatoxin isolated from *Caranx latus*. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 5914-5920.

Pottier I, Vernoux JP, Lewis RJ (2001). Ciguatera fish poisoning in the Caribbean Islands and Western Atlantic *Rev Environ Contam Toxicol* 168, 99-141.

Pottier I (2002a). La ciguatera aux Antilles : épidémiologie, analyse de la C-CTX-1 et étude de la diversité des ciguatoxines dans les poissons toxicophores. Thèse, Université de Caen, 21 juin 2002, 271 pp.

Pottier I, Vernoux JP, Jones A, Lewis RJ (2002b). Characterization of multiple Caribbean ciguatoxins and congeners in individual specimens of horse-eye-jack (*Caranx latus*) by high performance liquid chromatography/mass spectrometry *Toxicon* 40, 929-939.

Yasumoto T (1998). Fish poisoning due to toxins of microalgal origins in the Pacific. *Toxicon* 36, 1515-1518.

Yasumoto T, Igarashi T, Legrand AM, Cruchet P, Chinain M, Fujita T, Naoki H (2000). Structural elucidation of ciguatoxin congeners by fast-atom bombardment tandem mass spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 4988-4989.

Yasumoto T (2001). The chemistry and biological function of natural marine toxins. *Chem. Rec.* 1, 228-242.

Yogi K, Sakugawa S, Oshiro N, Ikehara T, Sugiyama K, Yasumoto T, 2014. Determination of Toxins Involved in Ciguatera Fish Poisoning in the Pacific by LC/MS. *J AOAC Int* 97, 398-403.

Pour les essais sur animaux

Bagnis R, Chanteau S, Chungue E, Drollet JH, Lechat I, Legrand AM, Pompom A, Prieur C, Roux J, Tetaria C (1985) Comparison of the cat bioassay, the mouse bioassay and the mosquito bioassay to detect ciguatoxicity in fish. In proceedings of the 5th international Coral Reef Congress, Tahoto, French polynesia, 4, 491-496

Granade HR, Cheng P, Doorenbos NJ (1976) Ciguatera-Brine shrimp (*Artemia salina*) larvae assay for ciguatera toxins. *J. Pharm. Sci.* 65, 1414-1415

Labrousse H and Matile L (1996). Toxicological biotest on *Diptera larvae* to detect ciguatoxins and various other toxic substances. *Toxicon* 34, 881-891.

Vernoux JP (1991). Moyens d'investigation pour confirmer une intoxication de type ciguaterique. In "Biotoxines marines" (JM Fremy ed) CNEVA publication Dec 1991 : pp15"-161

Vernoux JP, Lahlou N, Magras LP, Greaux JB (1985) Chick feeding test: a simple system to detect ciguatoxin. *Acta Tropica* 42, 225-233

Vernoux JP, Lahlou (1986) Controle biologique de la ciguatoxine chez le poussin; analyse des symptômes induits et de la toxicité d'extraits de poissons ciguatoxiques de l'île de Saint Barthélemy. *Bull Soc Pathol Exot* 79 :140-147.

Vernoux JP, Magras LP, Abbad el Andaloussi S, Rieyche N (1986) Evaluation des niveaux de toxicité ciguaterique des différents étages de la chaîne trophique pisciaire marine présente autour de l'île de saint barthélémy aux antilles françaises. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 79, 275-283.

Pour les bio-essais souris

Caillaud A, de la Iglesia P, Darius HT, Pauillac S, Aligizaki K, Fraga S, Chinain M, Diogene J (2010). Update on methodologies available for ciguatoxin determination: perspectives to confront the onset of ciguatera fish poisoning in Europe. *Mar Drugs* 8, 1838-1907.

- EFSA (European Food Safety Authority), Panel on Contaminants in the Food Chain (2010). Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Emerging toxins: EFSA Journal 2010; 8(6): 1627-, 38 pp.
- Hamilton B, Hurbungs M, Vernoux JP, Jones A, Lewis RJ (2002). Isolation and characterisation of Indian Ocean ciguatoxin. *Toxicon* 40, 685-693.
- Hamilton B, Whittle N, Shaw G, Eaglesham G, Moore MR, Lewis RJ (2010). Human fatality associated with Pacific ciguatoxin contaminated fish. *Toxicon* 56, 668-673.
- Hashimoto Y (1979). Hypervitaminose A caused by fish liver, page 114. In: *Marine toxins and other bioactive marine metabolites*, Japan Scientific Societies Press, 369 pp.
- Hoffman PA, Granade HR, McMillan JP (1983). The mouse ciguatoxin bioassay: a dose-response curve and symptomatology analysis. *Toxicon* 21, 363-369.
- Lehane L and Lewis RJ (2000). Ciguatera: recent advances but the risk remains. *Int J Food Microbiol* 61, 91-125.
- Lewis RJ (2003). Detection of toxins associated with ciguatera fish poisoning. In: Hallegreaff GM, Anderson DM, Cembella AD, editors. *Manual on harmful marine algae*. Paris (France): UNESCO, p. 267–277.
- Lewis RJ and Holmes MJ (1993). Origin and transfer of toxins involved in ciguatera. *Comparative biochemistry and physiology. C, Comparative pharmacology and toxicology* 106, 615-628.
- Lewis RJ and Sellin M (1993). Recovery of ciguatoxin from fish flesh. *Toxicon* 31, 1333-1336.
- Lewis RJ, Sellin M, Poli MA, Norton RS, MacLeod JK, Sheil MM (1991). Purification and characterization of ciguatoxins from moray eel (*Lycodontis javanicus*, *Muraenidae*). *Toxicon* 29, 1115-1127.
- Pottier I, Vernoux JP, Lewis RJ (2001). Ciguatera fish poisoning in the Caribbean Islands and Western Atlantic. *Rev Environ Contam Toxicol* 168: 99-141.
- Quod JP, Ten-Hage L, Molgo J, Benoit E, Turquet J, Bourdeau P (2001). La singularité des phycotoxines par rapport aux autres toxines marines, In: *Toxines d'algues dans l'alimentation*, JM Frémy & P Lassus coordinateurs, Edition Ifremer, p231-247.
- US-FDA - Food and Drug Administration (2011). Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance, 4th Edition, Chapter 6: Natural Toxins, 14 pp. <http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM252395.pdf>
- Vernoux JP (1988). La ciguatera dans l'île de Saint-Barthélemy : aspects épidémiologiques, toxicologiques et préventifs. *Oceanologica Acta* 11.
- Vernoux JP (1994). The mouse ciguatoxin bioassay: directions for use to control fish for consumption. *Memoirs of the Queensland Museum* 34, 625-629.
- Vernoux JP and Talha F (1989). Fractionation and purification of some muscular and visceral ciguatoxins extracted from Caribbean fish. *Comparative Biochemistry and Physiology* 94B:499-504
- Wong CK, Hung P, Lee KLH, Kam KM (2005). Study of an outbreak of ciguatera fish poisoning in Hong Kong. *Toxicon* 46, 563-571.
- Wong CK, Hung P, Lee KL, Kam KM (2009). Solid-phase extraction clean-up of ciguatoxin-contaminated coral fish extracts for use in the mouse bioassay. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 26, 236-247.
- Pour le Neuro 2a**
- Caillaud A, Eixarch H, de la Iglesia P, Rodriguez M, Dominguez L, Andree KB, Diogène J (2012). Towards the standardisation of the neuroblastoma (neuro-2a) cell-based assay for ciguatoxin-like toxicity detection in fish: application to fish caught in the Canary Islands. *Food Addit and Cont* 29(6), 1000–1010.
- Cañete E and Diogène J. (2008). Comparative study of the use of neuroblastoma cells (neuro-2a) and neuroblastoma glioma hybrid cells (NG108-15) for the toxic effect quantification of marine toxins. *Toxicon* 52, 541–550.

Dechraoui, MYB, Tiedeken JA, Persad R, Wang Z, Granade HR, Dickey RW, Ramsdell JS (2005). Use of two detection methods to discriminate ciguatoxins from brevetoxins: Application to great barracuda from Florida Keys. *Toxicon*, 46, 261–270.

Lewis RJ (2003). Detection of toxins associated with ciguatera fish poisoning. In: Hallegreaff GM, Anderson DM, Cembella AD, editors. *Manual on harmful marine algae*. Paris (France): UNESCO, p. 267–277.

Manger R, Leja L, Lee S, Hungerford J, Hokama Y, Dickey R, Granade H, Lewis R, Yasumoto T, Wekell M. (1995). Detection of sodium channel toxins: directed cytotoxicity assays of purified ciguatoxins, brevetoxins, saxitoxins, and seafood extracts. *J AOAC Int.* 78,521-527.

Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 65, 55-63.

Pour le RBA

AOAC News. 2012. Marine and Freshwater toxins community tackles emerging toxins, validations and training. *AOAC Int*, p 15-16.

Barchi RL and Weigele JB 1979. Characteristics of saxitoxin binding to the sodium channel of sarcolemma isolated from rat skeletal muscle. *J Physiol*, 295 : 383-396.

Bottein Dechraoui MY, Ramsdell JS (2003). Type B brevetoxins show tissue selectivity for voltage-gated sodium channels: comparison of brain, skeletal muscle and cardiac sodium channels. *Toxicon* 41(7), 919-927.

Bottein Dechraoui MY, Tiedeken JA, Persad R, Wang Z, Granade HR, Dickey RW, Ramsdell JS (2005). Use of two detection methods to discriminate ciguatoxins from brevetoxins: Application to great barracuda from Florida Keys. *Toxicon* 46 (3), 261-270.

Bottein Dechraoui MY, Wang Z, Ramsdell JS (2007). Optimization of ciguatoxin extraction method from blood for Pacific ciguatoxin (P-CTX-1). *Toxicon* 49(1), 100-105.

Caillaud A, de la Iglesia P, Darius HT, Pauillac S, Aligizaki K, Fraga S, Chinain M, Diogene J (2010). Update on methodologies available for ciguatoxin determination: perspectives to confront the onset of Ciguatera Fish Poisoning in Europe. *Mar Drug* 8, 1838-1907.

Chinain M, Darius HT, Ung A, Cruchet P, Wang Z, Ponton D, Laurent D, Pauillac S (2010a). Growth and toxin production in the ciguatera-causing dinoflagellate *Gambierdiscus polynesiensis* (*Dinophyceae*) in culture. *Toxicon* 56, 739-750.

Chinain M, Darius HT, Ung A, Tchou Fouc M, Revel T, Cruchet P, Pauillac S, Laurent D (2010b). Ciguatera risk management in French Polynesia: the case study of Raivavae Island (Australes Archipelago). *Toxicon* 56, 674-690.

Darius HT, Ponton D, Revel T, Cruchet P, Ung A, Tchou Fouc M, Chinain M (2007). Ciguatera risk assessment in two toxic sites of French Polynesia using the receptor-binding assay. *Toxicon* 50, 612-626.

Dechraoui-Bottein M-Y (1999). Etude du mode d'action des ciguatoxines, biotoxines marines responsable de la Ciguatera : comparaison aux brevetoxines et application a la detection des poissons toxiques. Thèse d'Université Française du Pacifique, 115p.

Dechraoui MY, Naar J, Pauillac S, Legrand AM (1999). Ciguatoxins and brevetoxins, neurotoxic polyether compounds active on sodium channels. *Toxicon* 37 (1), 125-143.

Dodd PR, Hardy JA, Oakley AE, Edwardson JA, Perry EK, Delaunoy JP (1981). A rapid method for preparing synaptosomes: comparison, with alternative procedures. *Brain Research* 226, 107-118.

Doucette GJ, Logan MM, Ramsdell JS, Van Dolah FM (1997). Development and preliminary validation of a microtiter plate-based receptor binding assay for paralytic shellfish poisoning toxins. *Toxicon* 35(5), 625-636.

Doucette GJ, Powell CL, Do EU, Byon CY, Cleves F, McClain SG (2000). Evaluation of ¹¹-[3H]-tetrodotoxin use in a heterologous receptor binding assay for PSP toxins. *Toxicon* 38(11), 465-474.

- Kerbrat AS, Darius HT, Pauillac S, Chinain M, Laurent D (2010). Detection of ciguatoxin-like and paralyzing toxins in *Trichodesmium spp.* from New Caledonia lagoon. *Marine Pollution Bulletin* 61(7-12), 360-366.
- Llewellyn LE, Negri AP, Doyle J, Baker PD, Beltran EC, Neilan BA (2001). Radioreceptor assays for sensitive detection and quantitation of saxitoxin and its analogues from strains of the freshwater cyanobacterium, *Anabaena circinalis*. *Environ Sci Technol*, 35(7), 1445-1451.
- Lombet A, Bidard JN, Ladzunski M (1987). Ciguatoxin and brevetoxins share a common receptor site on the neuronal voltage-dependent Na⁺ channel. *FEBS Letter* 219 (2), 355-359.
- McCall JR, Jacocks HM, Baden DG, Bourdelais AJ (2012). Development of a competitive fluorescence-based synaptosome binding assay for brevetoxins. *Harmful Algae*, 19 : 85-91.
- Pawlowicz R, Darius HT, Cruchet P, Rossi F, Caillaud A, Laurent D, Chinain M (2013). Evaluation of seafood toxicity in the Australes archipelago (French Polynesia) using the neuroblastoma cell-based assay. *Food Add and Cont - Part A* 30(3):567-586.
- Poli MA, Mende TJ, Baden DG (1986). Brevetoxins, unique activators of voltage-sensitive sodium channels, bind to specific sites in rat brain synaptosomes. *Molecular Pharmacology* 30(2), 129-135.
- Pottier I, Hamilton B, Jones A, Lewis RJ, Vernoux JP (2003). Identification of slow and fast-acting toxins in a highly ciguatoxic barracuda (*Sphyraena barracuda*) by HPLC/MS and radiolabelled ligand binding. *Toxicon* 42(6), 663-672.
- Van Dolah FM, Finley EL, Haynes BL, Doucette GJ, Moeller PD, Ramsdell JS (1994). Development of rapid and sensitive high throughput pharmacologic assays for marine phycotoxins. *Natural Toxins* 2, 189-196.

Pour les tests immunologiques

- Bienfang P, DeFelice S, Dowling A (2011). Quantitative evaluation of commercially available test kit for ciguatera in fish . *Food Nutr. Sci.* 2(6): 594-598
- Caillaud A, de la Iglesia P, Darius HT, Pauillac S, Aligizaki K, Fraga S, Chinain M, Diogene J (2010). Update on methodologies available for ciguatoxin determination: perspectives to confront the onset of Ciguatera Fish Poisoning in Europe. *Mar Drug* 8, 1838-1907.
- Campora CE, Hokama Y, Ebesu JSM (2006). Comparative analysis of purified Pacific and Caribbean ciguatoxin congeners and related marine toxins using a modified elisa technique. *J. Clin. Lab. Anal.* 20, 121–125.
- Campora CE, Hokama Y, Yabusaki K, Isobe M (2008). Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of ciguatoxin in fish tissue using chicken immunoglobulin Y. *J. Clin. Lab. Anal.* 22, 239–245.
- Campora C, Hokama Y, Tamaru C, Anderson B, Vincent D (2010). Evaluating the Risk of Ciguatera Fish Poisoning from Reef Fish Grown at Marine Aquaculture Facilities in Hawai'i. *J. World Aquac. Soc.* 41, 61–70.
- Dickey RW, Granade HR, McClure FD (1994). Evaluation of a solid-phase immunobead assay for detection of ciguatera-related biotoxins in Caribbean finfish. *Memoir. Queensl. Mus.* 34, 481-488.
- Ebesu JSM, Campora CE (2012). Comment on “ Quantitative evaluation of commercially available test kit for ciguatera in fish”. *Food Nutr.Sci.* 3(9): 1233-1237.
- Hirama M, Oishi T, Uehara H, Inoue M, Maruyama M, Oguri H, Satake M (2001). Total synthesis of ciguatoxin CTX3C. *Science* 294, 1904–1907.
- Hokama Y, Banner A, Boylan D (1977). A radioimmunoassay for the detection of ciguatoxin. *Toxicon* 15, 317–325.
- Hokama Y, Abad M, Kimura LH (1983). A rapid enzyme-immunoassay for the detection of ciguatoxin in contaminated fish tissues. *Toxicon* 21, 817–824.
- Hokama Y, Kimura LH, Abad MA, Yokochi I, Scheuer PJ, Nukina M, Yasumoto T, Baden DG, Shimizu Y (1984). An enzyme immunoassay for the detection of ciguatoxin and competitive inhibition by related natural polyether toxins. *Seafood Toxins, Am.Chem.Soc.*, 307-320

- Hokama Y, Osugi A, Honda S, Matsuo M (1985). Monoclonal antibodies in the detection of ciguatoxin and other toxic polyethers in fish tissues by a rapid poke stick test. In *Fifth International Coral Reef Congress*, Tahiti, French Polynesia; Gabrie, C.; Salvat, B., Eds.; 1985; pp. 449–456.
- Hokama Y, Honda S, Kobayashi M, Nakagawa L, Asahina A, Miyahara J (1988). Monoclonal antibody (MAb) in detection of ciguatoxin (CTX) and related polyethers by the stick-enzyme immunoassay (S-EIA) in fish tissues associated with ciguatera poisoning, In *Mycotoxins and Phycotoxins '88*; Natori, S.; Hashimoto, K.; Ueno, Y., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherland, pp.303–310.
- Hokama Y, Honda SAA, Asahina SY, Fong JML, Matsumoto CM, Gallacher TS (1989). Cross reactivity of ciguatoxin, okadaic acid, and polyethers with monoclonal antibodies. *Food agriculture Immunol.* 1, 29-35
- Hokama Y, Asahina A, Hong T, Shang E, Miyahara J (1990). Evaluation of the stick enzyme immunoassay in *Caranx* sp. and *Seriola dumerili* associated with ciguatera. *J. Clin. Lab. Anal.* 4, 363–366.
- Hokama Y, Hong T, Isobe M, Ichikawa Y, Yasumoto T (1992). Cross-reactivity of highly purified okadaic acid (OA), synthetic, spiroketal east sphere of OA and ciguatoxin. *J. Clin. Lab. Anal.* 6, 54-58.
- Hokama Y, Asahina A, Shang E, Hong T, Shirai J (1993). Evaluation of the Hawaiian reef fishes with the solid phase immunobead assay. *J. Clin. Lab. Anal.* 7, 26–30.
- Hokama Y, Takamaka W, Nishimura K, Bourke R, Sullivan PK, Ebesu JS (1998a). A simple membrane immunobead assay for detecting ciguatoxin and related polyethers from human ciguatera intoxication and natural reef fishes. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, 81, 1-9.
- Hokama Y, Nishimura K, Takenaka W, Ebesu JS (1998b). Simplified solid phase membrane immunobead assay (MIA) with monoclonal anti-ciguatoxin antibody (MAb-CTX) for detection of ciguatoxin and related polyether toxins. *Natural toxins* 7(1), 1-21.
- Inoue M, Uehara H, Maruyama M, Hirama M (2002) Practical total synthesis of ciguatoxin CTX3C by improved protective group strategy. *Org. Lett.* 4, 4551–4554.
- Inoue M, Miyazaki K, Uehara H, Maruyama M, Hirama M (2004). First-and second-generation total synthesis of ciguatoxin CTX3C. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101, 12013.
- Inoue M, Miyazaki K, Ishihara Y, Tatami A, Ohnuma Y, Kawada Y, Komano K, Yamashita S, Lee N, Hirama M (2006a). Synthesis of Ciguatoxin (CTX1B). *Synfacts* , 12, 1193–1193.
- Inoue M, Miyazaki K, Ishihara Y, Tatami A, Ohnuma Y, Kawada Y, Komano K, Yamashita S, Lee N, Hirama M (2006b). Synthesis of Ciguatoxin (CTX1B). *J. Am. Chem. Soc.* 128, 9352–9354.
- Inoue M, Lee N, Tsumuraya T, Fujii I, Hirama M (2009). Use of monoclonal antibodies as an effective strategy for treatment of ciguatera poisoning. *Toxicon* 53, 802–805.
- Kimura LH, Hokama Y, Abad MA, Oyama M, Miyahara JT (1982a) Comparison of three different assays for the assessment of ciguatoxin in fish tissues: radioimmunoassay, mouse bioassay and *in vitro* guinea pig atrium assay. *Toxicon* 20, 907–912.
- Kimura L, Abad M, Hokama Y (1982b). Evaluation of the radioimmunoassay (RIA) for detection of ciguatoxin (CTX) in fish tissues. *J. Fish Biol.* 21, 671–680.
- Legrand AM, Pauillac S, Deparis X, Chungue E (1998). Evaluation du kit de detection des poissons toxiques Cigua-check de la Société Oceanit test system, Rapport technique. IRM/OCE
- Lehane L and Lewis RJ (2000). Ciguatera: recent advances but the risk remains. *Int J Food Microbiol* 61, 91-125.
- Naar J, Pauillac S, Branaa P, Dechraoui MY, Chinain M, Legrand AM (1998). Improvement of antibody production to PbTx-2-type brevetoxins and development of a new radioimmuno-assay. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M.L., Wyatt, T. (Eds.). *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and Intergovernmental, Commission of UNESCO, pp. 287-290.

- Naar J, Branaa P, Chinain M, Pauillac S (1999). An improved method for the microscale preparation and characterization of hapten±protein conjugates: the use of cholesterol as a model for nonchromophore hydroxylated haptens. *Bioconj. Chem.* 10(6), 1143-1149.
- Naar J, Branaa P, Bottein-Dechraoui MY, Chinain M, Pauillac S (2001). Polyclonal and monoclonal antibodies to PbTx-2-type brevetoxins using minute amount of hapten±protein conjugates obtained in areversed micellar medium. *Toxicon* 39, 869-878.
- Nagumo Y, Oguri H, Tsumoto K, Shindo Y, Hiramama M, Tsumuraya T, Fujii I, Tomioka Y, Mizugaki M, Kumagai I (2004). Phage-display selection of antibodies to the left end of CTX3C using synthetic fragments. *J. Immunol. Meth.* 289, 137–146.
- Oguri H, Hiramama M, Tsumuraya T, Fujii I, Maruyama M, Uehara H, Nagumo Y (2003). Synthesis-based approach toward direct sandwich immunoassay for ciguatoxin CTX3C. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 7608-7612.
- Park DL (1994). Evolution of methods for assessing ciguatera toxins in fish. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 136, 1-20
- Pauillac S, Blehaut J, Cruchet P, Lotte C, Legrand AM (1995). Recent advances in detection of ciguatoxins in French Polynesia. In: Lassus, P., Arzul, G., Erard, P., Gentien, P., Marcaillou, C. (Eds.). *Harmful Marine Algal Blooms*. Lavoisier Intercept Ltd, pp. 801-808.
- Pauillac S, Naar J, Branaa P, Chinain M (1998). An improved method for the production of antibodies to lipophilic carboxylic hapten using small amount of hapten±carrier conjugates. *J. Immunol. Methods* 220, 105-114.
- Pauillac S, Sasaki M, Inoue M, Naar J, Branaa P, Tachibana K, Chinain M, Legrand AM (2000). Characterization of mice antisera elicited with a ciguatoxin tetracyclic synthetic ring fragment (JKLM) conjugated to carrier proteins. *Toxicon* 38, 669-685
- Pauillac S, Naar J, Mouratou B, Guesdon J (2002). Application of a modified version of Habeeb's trinitrophenylation method for the characterization of hapten–protein conjugates in a reversed micellar medium. *J. Immunol. Meth.* 263, 75-83.
- Pottier I, Vernoux JP, Lewis RJ (2001). Ciguatera fish poisoning in the Caribbean Islands and Western Atlantic *Rev Environ Contam Toxicol* 168: 99-141.
- Sasaki M, Inoue M, Tachibana K (1994). Synthetic studies toward ciguatoxin. Stereocontrolled construction of the KLM ring fragment. *J. Org. Chem.* 59, 715–717.
- Tsumoto K, Yokota A, Tanaka Y, Ui M, Tsumuraya T, Fujii I, Kumagai I, Nagumo Y, Oguri H, Inoue M (2008). Critical contribution of aromatic rings to specific recognition of polyether rings: The case of ciguatoxin CTX3C-ABC and its specific antibody 1C49. *J. Biol. Chem.* 283, 12259–12266.
- Tsumuraya T, Fujii I, Inoue M, Tatami A, Miyazaki K, Hiramama M (2006). Production of monoclonal antibodies for sandwich immunoassay detection of ciguatoxin 51-hydroxyCTX3C. *Toxicon* 48, 287-294.
- Tsumuraya T, Fujii I, Hiramama M (2010). Production of monoclonal antibodies for sandwich immunoassay detection of Pacific ciguatoxins. *Toxicon* 56, 797-803.
- Ui M, Tanaka Y, Tsumuraya ;, Fujii I, Inoue M, Hiramama M, Tsumoto K (2008). How protein recognizes ladder-like polycyclic ethers - Interactions between ciguatoxin (CTX3C) fragments and its specific antibody 10C9. *J. Biol. Chem.* 283, 19440–19447.

Pour la LC-MS/MS

- Abraham A, Jester ELE, Granade HR, Plakas SM, Dickey RW (2012). Caribbean ciguatoxin profile in raw and cooked fish implicated in ciguatera. *Food Chem.* 131, 192-198.
- Boisier P, Ranaivoson G, Rasolofonirina N, Andriamahefazafy B, Roux J, Chanteau S, Satake M, Yasumoto T (1995). Fatal mass poisoning in Madagascar following ingestion of a shark (*Carcharhinus leucas*) - clinical and epidemiologic aspects and isolation of toxins. *Toxicon* 33, 1359-1364.

Caillaud A., de la Iglesia P, Barber E, Eixarch H, Mohammed-Noor N, Yasumoto T, Diogène J (2011). Monitoring of dissolved ciguatoxin and maitotoxin using solid-phase adsorption toxin tracking devices: Application to Gambierdiscus pacificus in culture. Harmful Algae 10(5), 433-446.

Dickey RW (2008). Ciguatera toxins: chemistry, toxicology and detection. Chapter 22 in. Seafood and freshwater toxins - Pharmacology, Physiology and Detection; ed. L. Botana. CRC Press, Taylor & Francis Group, ISBN: 0-8493-7437-5.

EFSA (European Food Safety Authority), Panel on Contaminants in the Food Chain; Scientific (2010). Opinion on marine biotoxins in shellfish – Emerging toxins: Ciguatoxin group. EFSA Journal 2010; 8(6):1627- [38 pp.].

Hamilton B, Hurbungs M, Vernoux JP, Jones A, Lewis RJ (2002). Isolation and characterisation of Indian Ocean ciguatoxin. Toxicon 40, 685-693.

Hamilton B, Whittle N, Shaw G, Eaglesham G, Moore MR, Lewis RJ (2010). Human fatality associated with Pacific ciguatoxin contaminated fish. Toxicon 56, 668-673.

Lewis RJ and Jones A (1997). Characterization of ciguatoxins and ciguatoxin congeners present in ciguateric fish by gradient reverse-phase high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. Toxicon 35, 159-168.

Lewis RJ, Jones A, Vernoux JP (1999). HPLC/tandem electrospray mass spectrometry for the determination of sub-ppb levels of Pacific and Caribbean ciguatoxins in crude extracts of fish. Anal. Chem. 71, 247-250.

Lewis RJ, Yang AJ, Jones A (2009). Rapid extraction combined with LC-tandem mass spectrometry (CREM-LC/MS/MS) for the determination of ciguatoxins in ciguateric fish flesh. Toxicon 54, 62-66.

Pleasance S, Quilliam MA, de Freitas ASW, Marr JC, Cembella AD (1990). Ion-spray mass spectrometry of marine toxins. II. Analysis of diarrhetic shellfish toxins in plankton by liquid chromatography/mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 4, 206-213.

Pottier I, Vernoux JP, Jones A, Lewis RJ (2002). Characterization of multiple Caribbean ciguatoxins and congeners in individual specimens of horse-eye-jack (*Caranx latus*) by high performance liquid chromatography/mass spectrometry Toxicon 40, 929-939.

Rehmann N, Hess P, Quilliam MA (2008). Discovery of new analogs of the marine biotoxin azaspiracid in blue mussels (*Mytilus edulis*) by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 22, 549-558.

Stewart I, Eaglesham GK, Poole S, Graham G, Paulo C, Wickramasinghe W, Sadler R, Shaw GR (2010). Establishing a public health analytical service based on chemical methods for detecting and quantifying Pacific ciguatoxin in fish samples. Toxicon 56, 804-812.

Suzuki, T., Watanabe, R., Matsushima, R., Ishihara, K., Uchida, H., Kikutsugi, S., Harada, T., Nagai, H., Adachi, M., Yasumoto, T., Murata, M., (2013). LC-MS/MS analysis of palytoxin analogues in blue humphead parrotfish *Scarus ovifrons* causing human poisoning in Japan. Food Additives & Contaminants: Part A 30, 1358-1364.

US-FDA - Food and Drug Administration (2011). Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance, 4th Edition, Chapter 6: Natural Toxins, 14 pp. <http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM252395.pdf>

Yogi K, Oshiro N, Inafuku Y, Hiramama M, Yasumoto T (2011). Detailed LC-MS/MS analysis of ciguatoxins revealing distinct regional and species characteristics in fish and causative alga from the Pacific. Anal. Chem. 83, 8886-8891.

► Concentrations considérées sans risque pour l'Homme

Darius HT, Dresche, O, Ponton D, Pawlowicz D, Laurent S, Dewailly E, Chinain M (2013). Use of folk tests to detect ciguateric fish: A scientific evaluation of their effectiveness in Raivavae Island (Australes, French Polynesia). Food Add and Cont - Part A 30 (3), 550-566.

Dickey RW (2008). Ciguatera toxins: chemistry, toxicology and detection. Chapter 22 in. Seafood and freshwater toxins - Pharmacology, Physiology and Detection; ed. L. Botana. CRC Press, Taylor & Francis Group, ISBN: 0-8493-7437-5.

Dickey RW and Plakas SM (2010). Ciguatera : a health perspective. *Toxicon* 56, 123-136.

EFSA (European Food Safety Authority), Panel on Contaminants in the Food Chain (2010). Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Emerging toxins: Ciguatoxin group. *EFSA Journal* 2010; 8(6):1627- [38 pp.].

Lehane L and Lewis RJ (2000). Ciguatera: recent advances but the risk remains. *Int J Food Microbiol* 61, 91-125.

US-FDA - Food and Drug Administration (2011). Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance, 4th Edition, Chapter 6: Natural Toxins, 14 pp. <http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM252395.pdf>

Vernoux, JP and Lewis RJ (1997). Isolation and characterisation of Caribbean ciguatoxins from the horse-eye jack (*Caranx latus*). *Toxicon* 35, 889-900.

Pour les éléments d'éthologie des requins tigre et bouledogue

Programme CHARC : Connaissances de l'écologie et de l'Habitat de deux espèces de Requins Côtiers sur la côte Ouest de la Réunion, <http://www.la-reunion.ird.fr/le-programme-charc>

Brunnschweiler J M, Queiroz N, Sims DW (2010). Oceans apart? Short-term movements and behaviour of adult bull sharks *Carcharhinus leucas* in Atlantic and Pacific Oceans determined from pop-off satellite archival tagging. *Journal of fish biology*, 77, 1343-58.

Heithaus MR, Dill LM, Marshall GJ, Buhleier B (2002). Habitat use and foraging behaviour of tiger sharks (*Galeocerdo cuvier*) in a seagrass ecosystem. *Marine Biology*. 140, 237–248.

Meyer CG, Clark TB, Papastamatiou YP, Whitney NM, Holland KN (2009). Long-term movement patterns of tiger sharks *Galeocerdo cuvier* in Hawaii. *Marine Ecology Progress Series*, 381:223-235.

Rand GM, Wells PG, McCarthy LS (1995). Introduction to aquatic ecology. G.M. Rand (Ed.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology*, Taylor and Francis, London, pp. 3–53.

Snelson FF, Mulligan TJ, Williams SE (1984). Food habits, occurrence and population structure of the Bull Shark, *Carcharhinus leucas*, in Florida coastal lagoons. *Bulletin of Marine Science*, 34(1), 71-80.

Stevens JD and Mc Loughlin KJ (1991). Distribution, size and sex composition, reproductive biology and diets of sharks from northern Australia. *Aust. J. Mar. Freshw. Res* 42: 151–199.

Werry JM, Planes S, Berumen ML, Lee KA, Braun CD, Clua E (2014). Reef-fidelity and migration of tiger sharks, *Galeocerdo cuvier*, across the Coral Sea. *PLoS ONE* 9(1): e83249. doi:10.1371/journal.pone.0083249.

6.2 Normes

NF X 50-110 (mai 2003) Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise. AFNOR (indice de classement X 50-110).

6.3 Législation et réglementation

Arrêté préfectoral n°3621/2009/SG/DRCTCV du 24 décembre 2009 réglementant la commercialisation de certaines espèces de poissons marins tropicaux. Préfecture de La Réunion.

Règlement (CE) n°854/2004 du Parlement Européen et du Conseil du 29 avril 2004 fixant les règles spécifiques d'organisation des contrôles officiels concernant les produits d'origine animale destinés à la consommation humaine.

ANNEXES

Annexe 1 : Lettre de saisine

2013 -SA- 0 1 9 8

COURRIER ARRIVE

16 OCT. 2013

DIRECTION GENERALE

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE, DE L'AGROALIMENTAIRE ET DE LA FORET

Direction Générale de l'Alimentation
Service de l'Alimentation
Sous-direction de la Sécurité Sanitaire des Aliments
Bureau des produits de la mer et d'eau douce
251, rue de Vaugirard
75732 Paris cedex 15

Le Directeur Général de l'Alimentation

à

Monsieur le Directeur Général de l'Agence
nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,
de l'environnement et du travail

Dossier suivi par : Virginie HOSSEN & Pierre VELGE
Tél. : 01 49 55 84 95 & 60 44
Mél : bpmed.sdssa.dgal@agriculture.gouv.fr
Réf. : 13-129 Saisine_Requin_974 n°

27-31, avenue du Général Leclerc
94701 MAISONS-ALFORT CEDEX

- 0 4 2 8

Paris, le 14 OCT. 2013

Objet : Saisine relative à l'évaluation du risque lié à la consommation de deux espèces de requins.

Conformément à l'article R. 1313-1 du code de la santé publique, j'ai l'honneur de saisir l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail en vue de l'évaluation du risque lié à la consommation de deux espèces de requins notamment vis-à-vis du risque lié aux toxines ciguatériques.

A- Contexte

Le département de la Réunion dispose depuis plusieurs années d'une réglementation spécifique qui restreint ou interdit la commercialisation de certaines espèces de poissons au regard du risque d'intoxication par des biotoxines marines (et particulièrement la ciguatera).

A ce jour, l'arrêté préfectoral n°3621 en date du 24 décembre 2009 (ci-joint) interdit la commercialisation de la plupart des espèces de requins, et notamment les carcharinidae, ainsi qu'une vingtaine d'autres espèces de poissons susceptibles de contenir des biotoxines et notamment de la ciguatoxine.

Monsieur le Préfet de la Réunion m'a sollicité afin que soit ré-évalué le risque lié à la consommation de deux espèces de requins, aujourd'hui interdits par arrêté. Il s'agit du requin tigre (*Galeocerdo cuvier*) et du requin bouledogue (*Carcharhinus leucas*).

Afin de ré-évaluer le risque ciguatérique chez ces 2 espèces, les services de la préfecture de la Réunion envisagent un diagnostic par le biais d'une campagne de prélèvements à hauteur de 45 spécimens par espèce sur lesquels la recherche de la ciguatoxine sera réalisée par un bio-essai sur souris.

B- Questions adressées à l'ANSES

Dans ce contexte, je vous saurais gré de bien vouloir examiner les questions suivantes :

1. **A la lueur des connaissances actuelles sur les espèces de requins tigre et bouledogue, de leur susceptibilité à accumuler des phycotoxines et métabolites de celles-ci, et de leurs implications dans des intoxications alimentaires (à Madagascar par exemple) peut-on envisager la consommation de ces espèces sans risque pour le consommateur ?**

En raison des avis précédemment émis par l'Agence en 2006 et 2009 relatifs à la consommation des poissons prédateurs pélagiques à la Réunion vis-à-vis du risque sanitaire lié au méthylmercure, l'Anses portera une attention particulière sur ce contaminant et intégrera la question de l'impact qu'aurait la consommation de requin sur l'exposition alimentaire totale à son évaluation.

2. **Quels sont les éléments nécessaires pour acquérir des informations robustes quant à l'innocuité de consommation de ces espèces ?**

Quelles sont les méthodes analytiques actuellement applicables à la détection et à la quantification des ciguatoxines dans la chair de requin ? Les résultats issus de ces méthodes peuvent-ils être utilisés pour mener une évaluation des risques sanitaires liés à une éventuelle autorisation de ces espèces pour la consommation humaine dans cette zone ?

Dans le cas où l'Anses identifierait une méthode d'analyse des ciguatoxines dans la chair de requin suffisamment fiable, quelles données seraient nécessaires pour mener cette évaluation et quelles recommandations pourraient être émises concernant le protocole de prélèvement du requin tigre et du requin bouledogue à la Réunion ? Il sera notamment pris en compte la zone géographique concernée et l'éthologie de ces 2 espèces de requin en termes de capacité de déplacements dans les eaux marines réunionnaises.

Les éléments de réponse apportés seront utiles pour la révision de l'arrêté préfectoral en cours.

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

Je vous remercie de bien vouloir accuser réception de la présente demande et de m'apporter une réponse dans un délai de 6 mois. Si ce délai n'est pas compatible avec d'autres saisines en cours de traitement au sein de l'agence, il pourra être adapté sans remettre en cause le calendrier actuel de travail déjà établi.

Le Directeur Général Adjoint
Chef du Service de la Coordination
des Actions Sanitaires - C. V. O.


Jean-Luc ANBOT

Copies :

- DGAL/ BAST
- DPMA
- LNR des biotoxines marines (Anses Maisons-Alfort)

Annexe 2 : Arrêté préfectoral n°3621/2009/SG/DRCTCV du 24 décembre 2009 réglementant la commercialisation de certaines espèces de poissons marins tropicaux, Préfecture de La Réunion.



PREFECTURE DE LA REUNION

SECRETARIAT GENERAL

Saint-Denis le

DIRECTION DES RELATIONS AVEC
LES COLLECTIVITES
TERRITORIALES ET LE CADRE DE
VIE

ARRETE N° 3621 /2009/SG/DRCTCV

Enregistré le

24 DEC 2009

Réglementant la commercialisation de certaines espèces de poissons marins tropicaux

LE PREFET DE LA REGION ET DU DEPARTEMENT DE LA REUNION

Officier de la Légion d'Honneur
Chevalier de l'Ordre National du Mérite

Vu les Règlements 178-2008, 852-2004, 853-2004, 854-2004, fixant notamment les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché des produits de la pêche ;

Vu la directive 97/78/CEE du conseil du 18 décembre 1997 fixant les principes relatifs à l'organisation des contrôles vétérinaires pour les produits en provenance des pays tiers introduits dans la communauté ;

Vu le code de la consommation et notamment son Art. L 212.1 ;

Vu le code rural, et notamment ses articles R231-12 à 19,

Vu l'arrêté ministériel du 16 mars 1982 (ministres de la consommation, de l'agriculture, de la mer), définissant les noms français officiels et dénominations admises des poissons marins ;

Vu l'arrêté ministériel du 25 juillet 1986 (ministres de l'agriculture, de l'économie et des finances, secrétaire d'Etat à la mer), relatif à la réglementation des conditions d'importation en France des produits de la mer et eau douce destinés à la consommation humaine ;

Vu l'arrêté préfectoral N° 06-2412/SG/DRCTCV du 30 juin 2006 réglementant la commercialisation de certaines espèces de poissons marins tropicaux ;

Vu le relevé de décision de la réunion du 3 novembre 2009 qui s'est tenue en présence du Directeur de la Direction des services vétérinaires, du Directeur régional des affaires maritimes, du Président du comité régional des pêches maritimes et de l'Agence pour la recherche et la valorisation marine ;

Considérant la situation de la Région REUNION dans la zone Océan Indien où sévit le phénomène « ciguatera » de façon endémique ;

Considérant la nécessité de protéger au mieux la population réunionnaise contre ce risque, au vu de ses habitudes alimentaires et d'une affinité particulière pour ces types de poissons à risque Ciguatérique ;

Considérant qu'il y a lieu d'appliquer une réglementation sanitaire uniforme entre les poissons issus de la pêche locale et les poissons issus de la pêche en pays tiers ;

ARRETE :

Article 1

Sans préjudice de l'application des autres dispositions réglementaires visées dans les textes de référence,

1.1 Sont interdits à la commercialisation sur le territoire du département de la REUNION :

1.1.1 Les poissons vénéneux des familles suivantes : Tétrodontidae, Molidae, Diodontidae, Cantigasteridae, Balistidae, Acanthuridae.

1.1.2 Les produits de la mer contenant des biotoxines telles que ciguatoxine ou toxines paralysantes des muscles.

1.2 Tout responsable de la première mise sur le marché de poisson est tenu de vérifier que ses produits répondent aux prescriptions du point 1.1 précité.

Article 2

Pour l'application du point 1.1.2. de l'article 1^{er} et au vu des connaissances actuelles notamment dans la zone de l'Océan Indien, la commercialisation des espèces suivantes en provenance de zones de pêche tropicales est interdite :

ESPECES DE POISSONS INTERDITES				
Famille	Genre	Espèce	Nom commun	Nom local
ACANTHURIDAE	<i>genus (1)</i>	<i>spp (2)</i>	poisson chirurgien	poisson chirurgien
BALISTIDAE	<i>genus</i>	<i>spp</i>	baliste	bourse
CARANGIDAE	<i>Caranx</i>	<i>ignobilis</i>	carangue grosse tête	carangue grosse tête
CARANGIDAE	<i>Caranx</i>	<i>lugubris</i>	carangue	carangue noire
CARANGIDAE	<i>Caranx</i>	<i>melampygus</i>	carangue aile bleue	carangue bleue
CARANGIDAE	<i>Carangoides</i>	<i>fulvoguttatus</i>	carangue amoureuse	carangue blanc
CARCHARINIDAE	<i>genus</i>	<i>spp</i>	requins gris, baleinier, tigre	requins gris, baleinier, tigre
CLUPEIDAE	<i>Herklotsichthys</i>	<i>quadrinaculatus</i>	hareng queue blanche	sardine queue blanche
CLUPEIDAE	<i>Amblygaster</i>	<i>sirm</i>	sardinelle tachetée	sardinelle tachetée
DIODONTIDAE	<i>genus</i>	<i>spp</i>	poisson porc-épic	poisson porc-épic
HEXANCHIDAE	<i>genus</i>	<i>spp</i>	requin gris	requin gris
LETHRINIDAE	<i>Gymnocranius</i>	<i>griseus</i>	empereur gris	capitaine pisa
LETHRINIDAE	<i>Gymnocranius</i>	<i>grandoculis</i>	empereur tatoué	capitaine blanc
LUTJANIDAE	<i>Lutjanus</i>	<i>gibbus</i>	lutjan bossu	vivanneau pagale
LUTJANIDAE	<i>Lutjanus</i>	<i>sebae</i>	bourgeois	bourgeois
LUTJANIDAE	<i>Lutjanus</i>	<i>bohar</i>	vara vara	vara vara
SCOMBRIDAE	<i>Gymnosarda</i>	<i>unicolor</i>	thon dents de chien	thon dents de chien
SCORPAENIDAE	<i>Pterois et Synancea</i>	<i>spp</i>	poisson scorpion	poisson scorpion
SERRANIDAE	<i>Cephalopholis</i>	<i>argus</i>	vielle cuisinier	prude

SERRANIDAE	<i>Variola</i>	<i>louti</i>	croissant queue jaune	grand queue
SERRANIDAE	<i>Plectropomus</i>	<i>maculatus</i>	babonne	babonne
SPHYRAENIDAE	<i>Sphyaena</i>	<i>barracuda</i>	barracuda	békine à dents
SPHYRNIDAE	<i>genus</i>	<i>spp</i>	requin marteau	requin marteau
TETRAODONTIDAE	<i>genus</i>	<i>spp</i>	tétron	poisson ballon

- (1) *genus* : tous les genres de la famille
- (2) *spp* : toutes les espèces du genre

Article 3

En dérogation à l'article 2 sont autorisées les espèces suivantes :

Famille	Genre	Espèce	Nom commun	Nom local
CARCHARINIDAE	<i>Prionace</i>	<i>glauca</i>	requin à peau bleue	requin à peau bleue
CARCHARINIDAE	<i>Carcharinus</i>	<i>longimanus</i>	requin pélagique	pointe blanche du large
SPHYRNIDAE	<i>Isurus</i>	<i>oxyrinchus</i>	requin maquereau	mako

Article 4

En dérogation à l'article 2 et en considérant la situation particulière de la REUNION par rapport au risque ciguatérique, les espèces suivantes pourront continuer à être commercialisées sous la responsabilité de leur détenteur lorsqu'elles auront été capturées dans les eaux territoriales réunionnaises.

Famille	Genre	Espèce	Nom commun	Nom local
CARANGIDAE	<i>Caranx</i>	<i>lugubris</i>	carangue	carangue noire
CARANGIDAE	<i>Caranx</i>	<i>ignobilis</i>	carangue	carangue grosse tête
CARANGIDAE	<i>Caranx</i>	<i>melampygus</i>	carangue aile bleue	carangue bleue
CARANGIDAE	<i>Carangoides</i>	<i>fulvoguttatus</i>	carangue amoureuse	carangue blanc'
CARCHARINIDAE	<i>Carcharinus</i>	<i>falciformis</i>	requin à peau soyeuse	requin à peau soyeuse
CLUPEIDAE	<i>Amblygaster</i>	<i>sirm</i>	sardinelle tachetée	sardinelle tachetée
CLUPEIDAE	<i>Herklotsichthys</i>	<i>quadrimaculatus</i>	hareng queue blanche	sardine queue blanche
LETHRINIDAE	<i>Gymnocranius</i>	<i>griseus</i>	empereur gris	capitaine pisa
LETHRINIDAE	<i>Gymnocranius</i>	<i>grandoculis</i>	empereur tatoué	capitaine blanc
LUTJANIDAE	<i>Lutjanus</i>	<i>gibbus</i>	lutjan bossu	vivanneau pagaie
SCOMBRIDAE	<i>Gymnosarda</i>	<i>unicolor</i>	thon dents de chien	thon dents de chien
SERRANIDAE	<i>Cephalopholis</i>	<i>argus</i>	vielle cuisinier	prude
SERRANIDAE	<i>Variola</i>	<i>louti</i>	croissant queue jaune	grand queue * entier < 2,5kg

Article 5

Dans le cadre des dispositions juridiques relatives à l'obligation générale de sécurité du fait des produits défectueux :

- Les pêcheurs professionnels, les entreprises de pêche, de transformation ou de commercialisation concernées par les dérogations visées aux articles 3 et 4, devront s'assurer par des analyses régulières que ces espèces ne contiennent pas de biotoxines.
- Ils seront tenus de fournir un état annuel des résultats, d'informer immédiatement les services de l'Etat concernés en cas de résultat positif et de procéder sans délais au retrait de la commercialisation des poissons concernés.

Article 6

L'importation et l'introduction en vue de leur commercialisation sur le territoire de la Réunion d'espèces de poissons de l'Océan Indien non mentionnées par l'arrêté ministériel du 16 mars 1982 ou les avis aux importateurs parus au Journal Officiel de la République Française devra faire l'objet d'une autorisation préalable.

L'autorisation pourra être sollicitée sur présentation d'un dossier d'expertise préalable réalisé à la charge de l'opérateur par le Laboratoire ARVAM.

Au titre de l'alinéa précédent, font l'objet d'une dérogation les espèces suivantes :

Famille	Genre	Espèce	Nom commun	Nom local	Origine
LUTJANIDAE	<i>Lutjanus</i>	<i>sebae</i>	bourgeois	bourgeois	Seychelles
LUTJANIDAE	<i>Lutjanus</i>	<i>sebae</i>	bourgeois	bourgeois	Seychelles
LUTJANIDAE	<i>Lutjanus</i>	<i>sebae</i>	bourgeois	bourgeois	Madagascar (1)
LETHRINIDAE	<i>Gymnocranius</i>	<i>griseus</i>	Empereur gris	Capitaine pisa	Madagascar (1)
LETHRINIDAE	<i>Gymnocranius</i>	<i>grandoculis</i>	Empereur tatoué	Capitaine blanc	Madagascar (1)

(1) Zones côtières des provinces de Diego-Suarez et Tamatave comme figurant sur la carte ci-jointe

Article 7

La commercialisation des espèces dérogatoires, visées aux articles 3, 4 et 6, n'est autorisée que pour des entreprises régulièrement déclarées qui répondent aux exigences du règlement 852-2004 ou 853-2004. Elle peut être soumise à prélèvement libératoire, à charge de l'importateur, pour ce qui est des poissons en provenance de zones de pêche hors COI.

Ces entreprises devront tenir à la disposition des services de contrôle tous les documents permettant de justifier de l'origine des produits et procéder le cas échéant et dans les meilleurs délais, au retrait de la commercialisation des produits non conformes.

Article 8

Les listes des espèces de poissons interdits ou soumis à dérogation pourront être modifiées en fonction de l'évolution des données épidémiologiques et toxicologiques.

Article 9

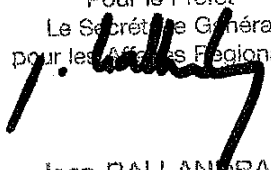
L'arrêté préfectoral N° 06-2412/SG/DRCTCV du 30 juin 2006 réglementant la commercialisation de certaines espèces de poissons marins tropicaux est abrogé.

Article 10

Le Secrétaire Général de la Préfecture, le Secrétaire Général pour les Affaires Economiques et Régionales, les Sous Préfets, les Maires des communes du département, le Directeur des Services Vétérinaires, le Directeur Régional des Affaires Maritimes, le Directeur Départemental de la Concurrence de la Consommation et de la Répression des Fraudes, le Directeur Régional de l'Action Sanitaire et Sociale, le Directeur Régional des Douanes, le Directeur Départemental de la Sécurité Publique, le Colonel Commandant le Groupement de Gendarmerie à La Réunion, sont chargés chacun en ce qui le concerne de l'exécution du présent arrêté qui sera publié au recueil des actes administratifs de la Préfecture.

Le Préfet,

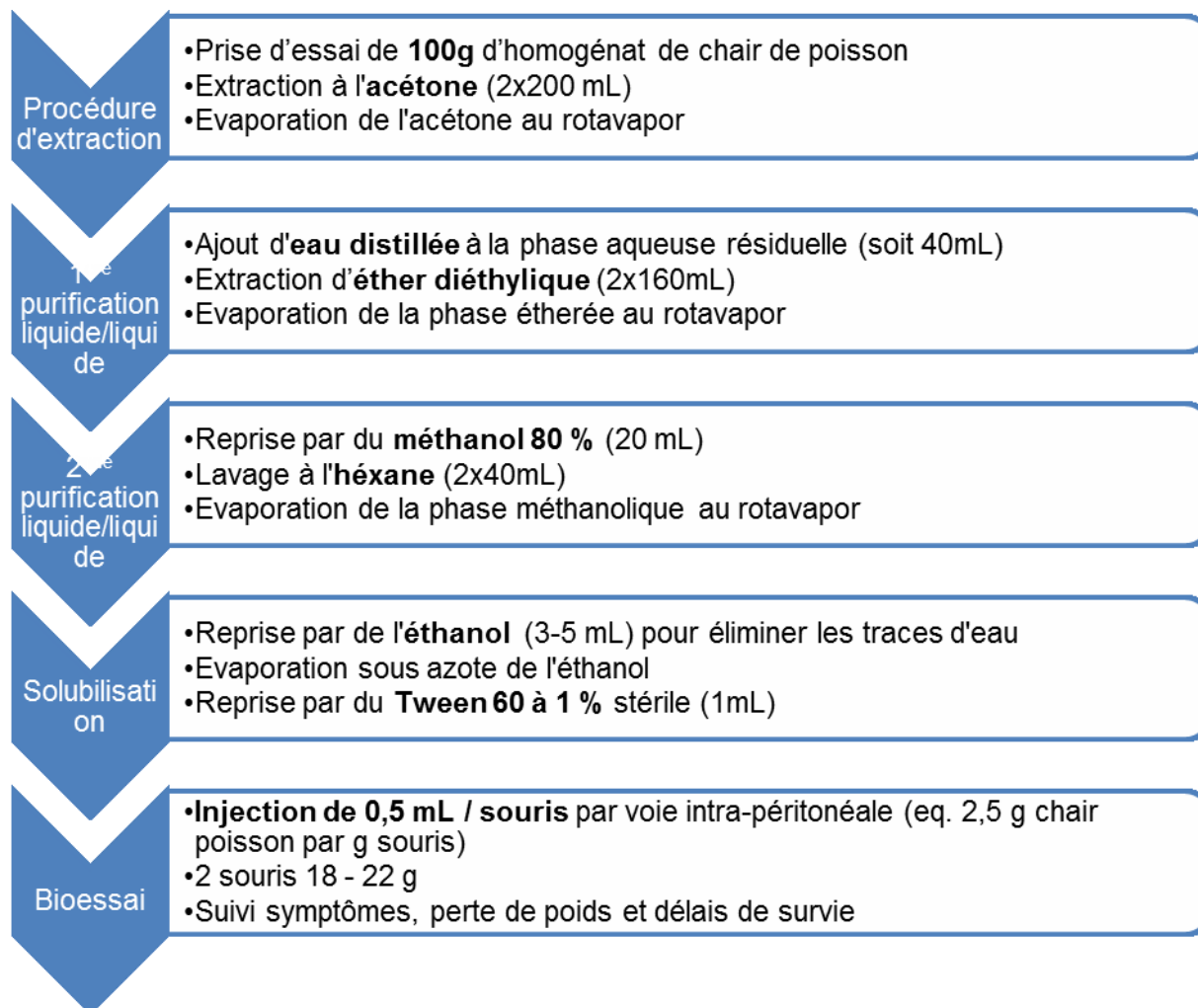
Pour le Préfet
Le Secrétaire Général
pour les Affaires Régionales


Jean BALLANDRAS

Annexe 3 : Description détaillée de différentes variantes du bio-essai sur souris

Méthode Anses Maisons-Alfort CAT-NAT 10

Il s'agit de la méthode de détection des ciguatoxines dans les poissons par bio-essai sur souris utilisée par les laboratoires agréés de la Direction générale de l'Alimentation (ARVAM et LNR) dans le cadre des investigations de TIACs ciguatériques et des contrôles à l'importation. Elle est applicable aux poissons à l'état frais, congelé ou cuisiné.



L'évaluation de la toxicité de l'échantillon est basée sur le délai de survie des souris. La mort de 1 ou 2 souris dans les 24h est interprétée comme un résultat positif pour la présence de ciguatoxines (non comestible). La présence de symptômes typiques et/ou la perte de poids 24h après injection permettent également de déclarer l'échantillon positif (limite de comestibilité). Cette méthode ne permet pas de quantifier en l'absence d'étalon.

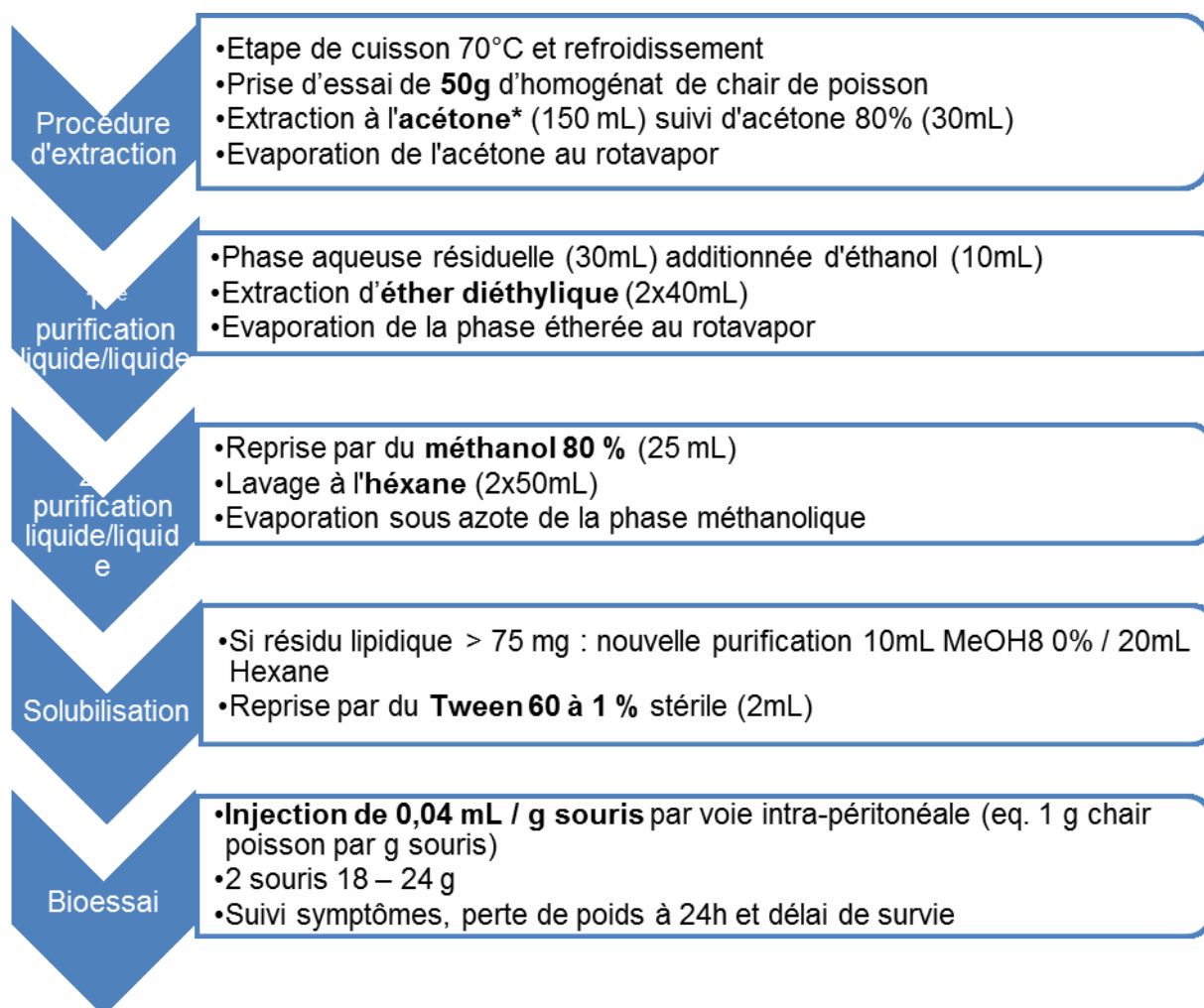
Les symptômes typiques de la présence de CTX sont diarrhée, piloérection, troubles respiratoires, dyspnée et parfois cyanose du pénis.

Mortalité à 24 h	Présence de symptômes typiques	Perte de poids > 5% 24 h après injection (pour au moins 1/2 souris)	Résultat
2/2	quels que soient les symptômes et/ou la perte de poids		POSITIF non comestible
1/2			POSITIF non comestible
0/2	oui	Oui	POSITIF limite de comestibilité
	oui	Non	
	non	oui *	
	non	Non	NEGATIF Comestible

* Dans le cas où aucun symptôme n'est observé alors qu'une perte de poids est notée au bout de 24h, la durée d'observation peut être prolongée à 48h. Si on observe une reprise totale du poids de l'animal au bout de 48h, le résultat pourra alors être déclaré en « limite de comestibilité – négatif ».

Méthode décrite par Vernoux (Vernoux, 1994)

Cette méthode a servi de base au LNR avant d'harmoniser le protocole précédent avec l'ARVAM en 2012.



* L'extraction au méthanol est possible lorsque le prélèvement de chair de poisson n'excède pas 10 g.

L'évaluation de la toxicité de l'échantillon est basée sur le délai de survie des souris. La mort de 1 ou 2 souris dans les 24 heures est interprétée comme un résultat positif pour la présence de ciguatoxines (non comestible). La perte de poids 24h (>5%) après injection permet également de déclarer l'échantillon positif (limite de comestibilité).

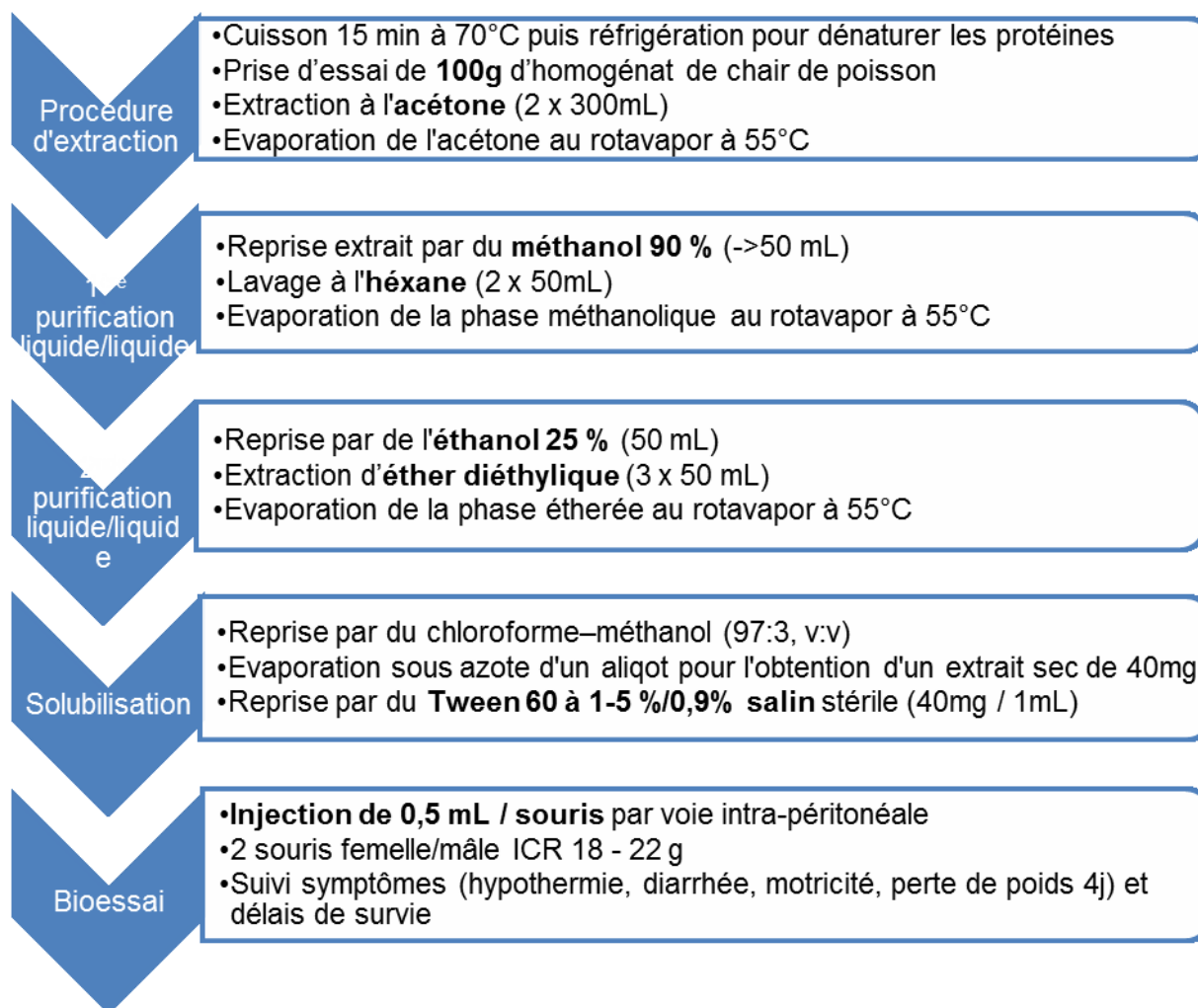
Mortalité à 24h	Perte de poids à 24h (> 5%)	Classe toxicité *	Interprétation
2/2	-	≥ 1 USg par g eq. chair	Non comestible
1/2	oui	0,5 à 1 USg par g eq. chair	Non comestible
0/2	oui	< 0,5 USg par g eq. chair**	Limite de comestibilité
	non		Comestible

* Une USg ou unité souris-gramme est définie comme la quantité de toxines capable de tuer en 24h un gramme de souris au plus dans des conditions d'injection de recherche de la dose létale minimale (DLM, mort d'au moins une souris) ou de la DL₅₀ (mort de la moitié des souris). La quantité de toxines est rapportée au poids corporel (en gramme) de la souris testée.

** Une étude sur 306 spécimens de poisson des Caraïbes de toxicité allant de 0,05 à 3,72 USg par gramme de chair de poisson a permis de déterminer une concentration toxinique minimale de 0,5 USg par gramme de chair (Vernoux, 1988), ce qui équivaut à 1,8 µg eq C-CTX-1 kg⁻¹ de chair de poisson. Le niveau d'action établi par l'US-FDA (2011) pour les C-CTXs est de 0,1 µg kg⁻¹ eq C-CTX-1.

Méthode décrite par Lewis (Lewis, 2003), figure page suivante

Les symptômes autres que ciguateriques sont rejetés pour éviter tout biais subjectif dans les observations (Hoffman et al., 1983). Les souris sont très surveillées pendant les 5 premières heures après injection puis contrôlées régulièrement jusqu'à 24h. Un suivi de la perte de poids est fait à 24h et à J4. En effet, la mesure de perte de poids corporel à seulement 24h ne reflète pas assez l'effet principal des extraits injectés. La mesure de perte de poids au jour 4 est plus appropriée que le premier jour pour observer les effets réels des extraits. Ceci peut être dû au fait que les souris ne peuvent pas être complètement rétablies après l'injection i.p. et les mesures de température corporelles rectales (optionnelle) peuvent affecter l'habitude alimentaire et le comportement des souris.



Méthode décrite par Wong avec purification SPE sur Florisil (Wong et al., 2009), figure page suivante

L'amélioration de la préparation de l'échantillon dans le but d'augmenter le seuil de détection et d'améliorer la quantification des CTXs dans la chair de poisson a été obtenue en ajoutant une étape de purification sur Florisil SPE pour augmenter la pureté des fractions d'éther (Wong et al., 2005, 2009). L'étape de purification sur cartouche Florisil permet de minimiser les interférences possibles dues aux lipides. Selon les auteurs, cette étape de purification supplémentaire améliore le taux de recouvrement de P-CTX-1 passant à 76 % contre 63 % avec le protocole standard.

L'équation est $\log(US) = 2,3 \log(1+1/T)$, où US est le nombre d'unités souris (1 US = DL₅₀) et T le temps de mortalité. La relation $\log(1+1/T)$ a été établie à partir de concentrations d'étalon de 10-70 ng 0,5mL⁻¹ Tween 60 1%/0,9% salin aux souris. Dans cette étude la DL₅₀ a été déterminée à 5,6 ng P-CTX-1.



Wong et al. (2005) a utilisé ce protocole lors d'une étude de TIAC à Hong Kong. Les doses sublétales ont été estimées entre 0,18 and 0,45 US/20 mg extrait injecté. Les échantillons trouvés positifs par bio-essai ont été analysés par un kit rapide Cigua-Check®. Le kit ne peut pas détecter de CTXs à un niveau inférieur à 0,05 µg kg⁻¹ chair et peut aussi produire des résultats faux positifs (Lehane and Lewis, 2000). Cette évaluation met en évidence les contradictions trouvées entre le bio-essai sur souris et le kit rapide d'immunodétection. L'auteur conclut donc qu'un nouvel examen devrait être effectué pour vérifier sa validité et fiabilité comme un outil pour la routine CTXs.

Annexe 4 : Description détaillée du protocole pour le test Neuro-2a

D'après Caillaud et al. (2012)

The extraction procedures may be revised if the assay was to be used in combination with other analytical methods, depending on the matrix (flesh, liver, viscera).

Extraction and purification procedure of CTXs from fish samples

Fish flesh were extracted and purified according to the protocol described in Lewis (2003). Briefly, 10 g portions of fish flesh was cooked at 70°C for 10 min and mixed for 5 min in 30 ml acetone (Ultraturax, 17,500 g). Acetone soluble extract was recovered after 5-min centrifugation at 600 g at 4°C (Joan MR23i, Saint Herblain, France) and filtrated using 0.45 mm nylon filters. The extraction with acetone was repeated twice and both acetone soluble extracts were pooled and dried on a rotary evaporator (Büchi R-200, Flawil, Switzerland).

The dried extract was further purified using liquid/liquid partition in order to eliminate excessive fatty acids that may interfere with the detection of CTXs. For that purpose, dried extract was dissolved in 5ml methanol:water (9:1) and partitioned twice with 5ml nhexane (1:1, v/v). The n-hexane fractions were discarded and the methanol:water fraction was dried for further purification (Büchi R-200). The dried extract was dissolved in 5ml ethanol:water (1:3) and partitioned twice with 5ml diethyl ether (1:1, v/v). The ethanol:water fraction was discarded and the diethyl ether fractions were pooled, dried, then dissolved in 4ml methanol and keep at -20°C until analysis.

Neuroblastoma (neuro-2 a) cell maintenance and cytotoxicity assay

Neuro-2a cells (ATCC, CCL131) were maintained in 10% foetal bovine serum (FBS) RPMI medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere (Binder, Tuttlingen, Germany) as described (Cañete and Diogène 2008). For experiments, cells were seeded in a 96-well microplate in 5% FBS RPMI medium at an approximate density of 35,000 cells per well. Cells were incubated in the same conditions of temperature and atmosphere as described for cell maintenance.

After 24-h incubation of the neuro-2a cells and just before exposure to fish extracts and CTX standard solution to test, one half part of the microplate received 0.1 mM ouabain (Sigma-Aldrich) and 0.01 mM veratridine (Sigma-Aldrich) allowing a reduction of 20% in cell viability (Canete and Diogène 2008). An equivalent amount of fish extract or P-CTX-1 standard solution to test is first evaporated until dryness under N₂ flux at 40° C (TurboVap, Caliper, Hopkinton, USA) to remove the methanol completely. Dried extracts are further dissolved in 5% FBS RPMI medium, serially diluted in the same medium and 10 ml of each concentration is directly added into the well of both halves of the microplate (with and without O/V treatment) in order to compare cell response in the presence and absence of O/V treatment. An equal volume in each well was corrected using phosphate buffer solution. All doses as well as all experiments were performed in triplicate.

The LOQ of P-CTX-1 for the method was evaluated using a non-toxic fish sample (when no toxic effects were observed with and without O/V treatment under the limit of tissue equivalent [TE] exposure set) spiked with P-CTX-1. For that purpose, neuro-2a cells were exposed to 20 mg TE ml⁻¹ spiked with P-CTX-1 at concentrations ranging from 0.01 to 10 pg P-CTX-1 mg TE⁻¹. Eight repetitions of this experiment were done during the same day in order to test the repeatability of the assay (intra-assay variability) and three repetitions of the same experiment were done on different days in order to test the reproducibility of the assay (inter-assay variability).

When toxicity of fish extracts was observed only in the presence of O/V treatment and under the limit of TE exposure, this toxicity was considered as Na⁺ channel-activating toxicity, and for this study it was considered as CTX-like toxicity, assuming no PbTx is present. The sensitivity of the neuro-2a cells to the presence of CTX was calibrated each day of the experiment with a standard solution of P-CTX-1 at 20 ng ml⁻¹. The CTX-like content in the samples tested was quantified after analysis of cell viability, as further described below.

Cytotoxicity evaluation and results analysis

After 24-h exposure of the neuro-2a cells to fish extracts and P-CTX-1 standard material, cell viability was used as an endpoint for cytotoxic effects measurement. Cell viability was assessed using the colorimetric [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium] MTT assay (Mosmann 1983). Absorbance values were read at 570nm using an automated multi-well scanning spectrophotometer (Biotek, Synergy HT, Winooski, VT, USA) and results were further analysed using the software Prism4 (GraphPad, San Diego, CA, USA). The viability of cells was expressed in relation to the viability of the corresponding cell control (with or without O/V treatment) and the 50% of effects ($IC_{50}^{O/V+}$) was calculated according to the dose–response curve obtained using a sigmoid regression curve with a variable Hill slope. In the present study we considered responses producing less than 20% cell mortality as a non-toxic effect; the concentration inhibiting 20% of cell viability (IC_{20}) was set as being the limit of detection (LOD) and the LOQ of the method. For a quantitative estimation of the content in P-CTX-1 equivalents in fish extracts, the concentration of P-CTX-1 standard material that induced 50% of toxic effects ($IC_{50}^{O/V+}$ for P-CTX-1) was used to estimate the concentration of P-CTX-1 eq. in fish TE considering the amount of TE that induced 50% of toxic effects ($IC_{50}^{O/V+}$ for fish TE). In borderline samples, the quantitative estimation of the content in P-CTX-1 equivalents was estimated at the LOQ of the method.

Significant differences between repetitions of experiments (intra- and inter-assay variability) were evaluated using ANOVA with a 95% confidence level.

1006 A. Caillaud et al.

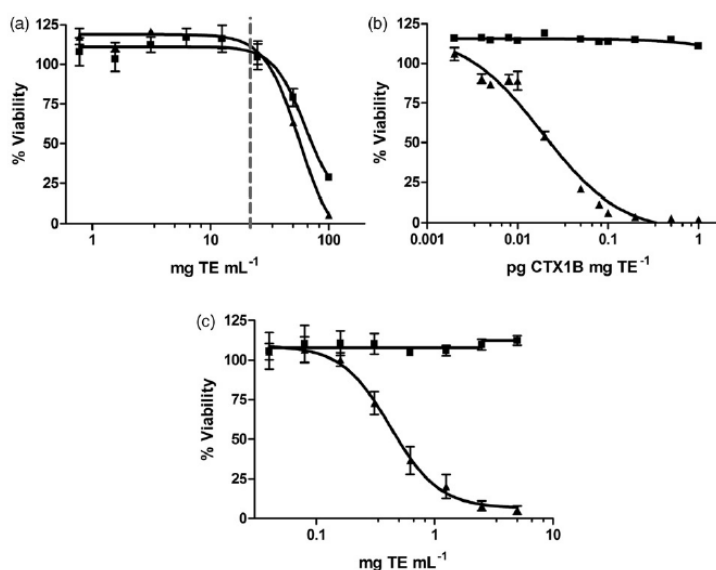


Figure 2. Dose–response curves of neuroblastoma (neuro-2a) cells exposed for 24h to a non-toxic fish sample (*S. fasciata*, sample 4) (a), non-toxic fish sample (*S. fasciata*, sample 4) spiked with CTX1B (b) and toxic fish sample (*S. fasciata*, sample 2) (c), with (▲) and without (■) O/V pretreatment. The limit of tissue equivalent (TE) exposure for matrix interferences is represented by a dotted vertical line.

Table 3. Repeatability and reproducibility of the response of the neuroblastoma (neuro-2a) cell based-assay exposed for 24 h to a non-toxic fish sample spiked with CTX1B.

Variability	<i>n</i>	$IC_{20}^{O/V+}$ (pg CTX-1 mg TB ⁻¹) ± SD	CV (%)	$IC_{50}^{O/V+}$ (pg CTX-1 mg TB ⁻¹) ± SD	CV (%)
Intra-assay	8	0.008 ± 0.002	23	0.023 ± 0.004	17
Inter-assay	3	0.009 ± 0.003	31	0.029 ± 0.006	19

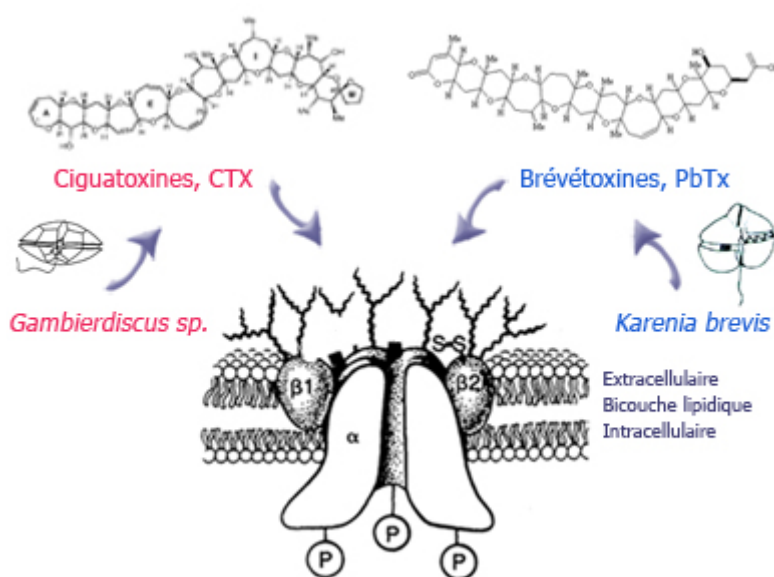
Notes: $IC_{20}^{O/V+}$ and $IC_{50}^{O/V+}$, concentration of CTX1B producing respectively 20% and 50% of toxic effects; *n*, number of replicates; TE, tissue equivalents; SD, standard deviation, CV, coefficient of variation.

Annexe 5 : Description détaillée du protocole pour le test RBA

D'après <http://www.ilm.pf/Testbinding>

Le principe de la méthode

Le canal sodium est une protéine trans-membranaire présente en grande quantité au niveau des membranes des cellules excitables qui laisse passer sélectivement les ions sodium. L'analyse de ce canal, purifié à partir de cerveaux de rat, a montré qu'il était constitué de trois sous-unités. Le schéma ci-contre représente la sous-unité alpha (α 260 kDa) associée aux sous-unités bêta 1 (β 1 36 kDa) et bêta 2 (β 2 33 kDa). La sous-unité β 1 est liée à la sous-unité α par des liaisons non covalentes alors que la sous-unité β 2 est liée par des ponts disulfures (S-S). Les trois sous-unités sont fortement glycosylées sur la face externe de la molécule et la sous-unité α possède de nombreux sites de phosphorylation (P) au niveau de sa surface interne.



Fixation spécifique à haute affinité sur le site 5 de la sous-unité α du canal sodium (schéma modifié d'après Catterall 1986)

Les sites de fixation des toxines marines (STXs, TTXs, PbTx, CTXs,)

Des études pharmacologiques de compétition, de mesure du flux ionique (^{22}Na) et de mutagenèse ont permis d'identifier sur les canaux sodium de mammifères six sites récepteurs, numérotés de 1 à 6. Ces sites sont les récepteurs de fixation de nombreuses neurotoxines associées au canal sodium activé par le potentiel d'action.

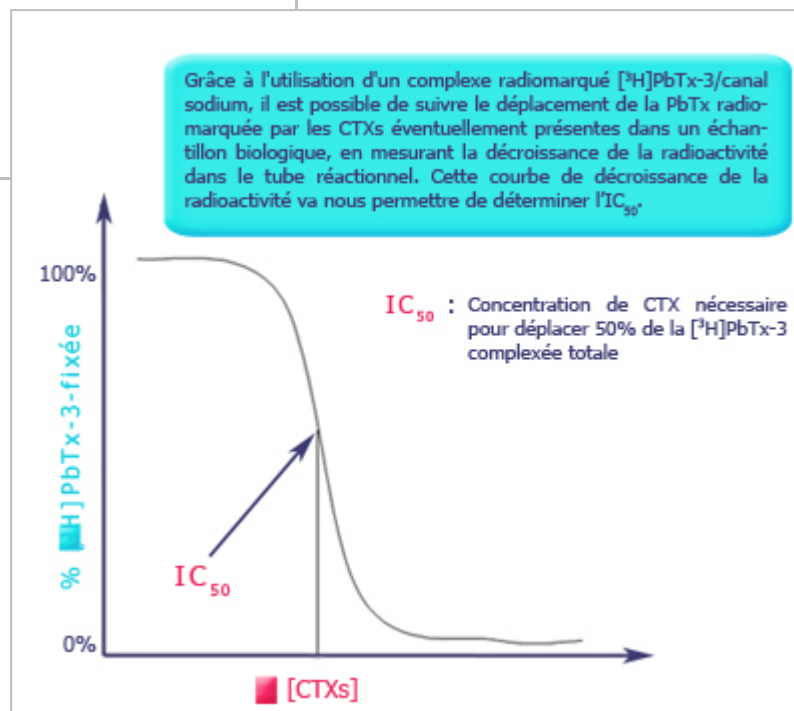
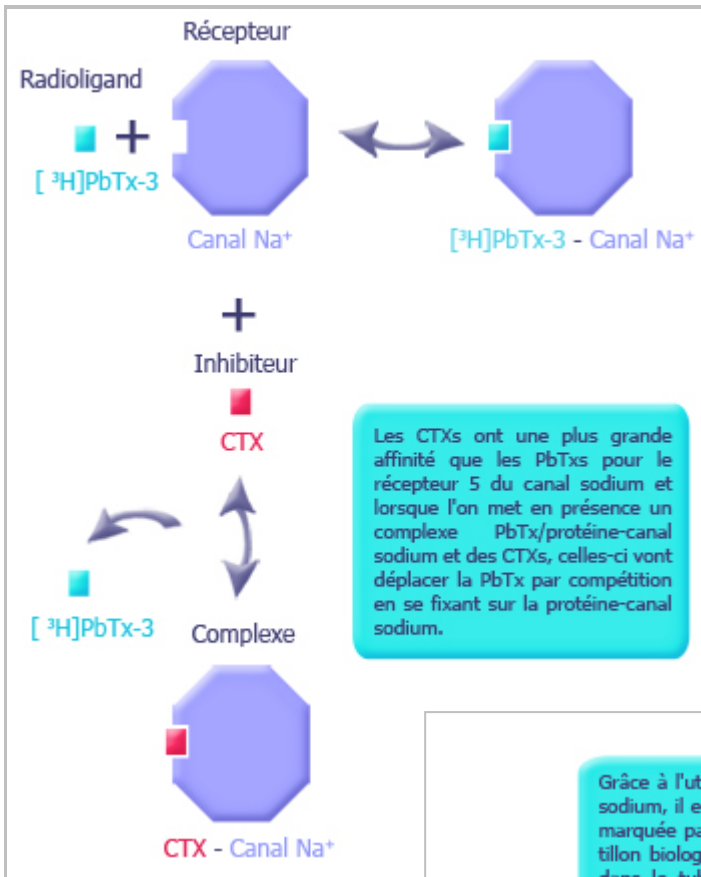
Le site 5 de la sous-unité alpha du canal sodium est le récepteur de 2 familles de toxines marines de type polyéther : les ciguatoxines (CTXs) et les brevétotoxines (PbTx), synthétisées respectivement par les dinoflagellés *Gambierdiscus spp.* et *Karenia brevis*.

La propriété de ces toxines de se fixer de façon spécifique sur le site 5 du canal sodium a permis d'élaborer un test de détection dit « Interaction ligand-récepteur ». Ce test permet ainsi de détecter et doser les CTXs présentes dans un échantillon d'algue ou de poisson.

► Le principe théorique

Si un radioligand (L^*) est mis en présence de son site récepteur (R), un complexe radioligand-récepteur se forme. Un équilibre s'établit entre ces deux états qui peut s'exprimer par l'équation suivante : $[L^*] + [R] \rightleftharpoons [L^*-R]$.

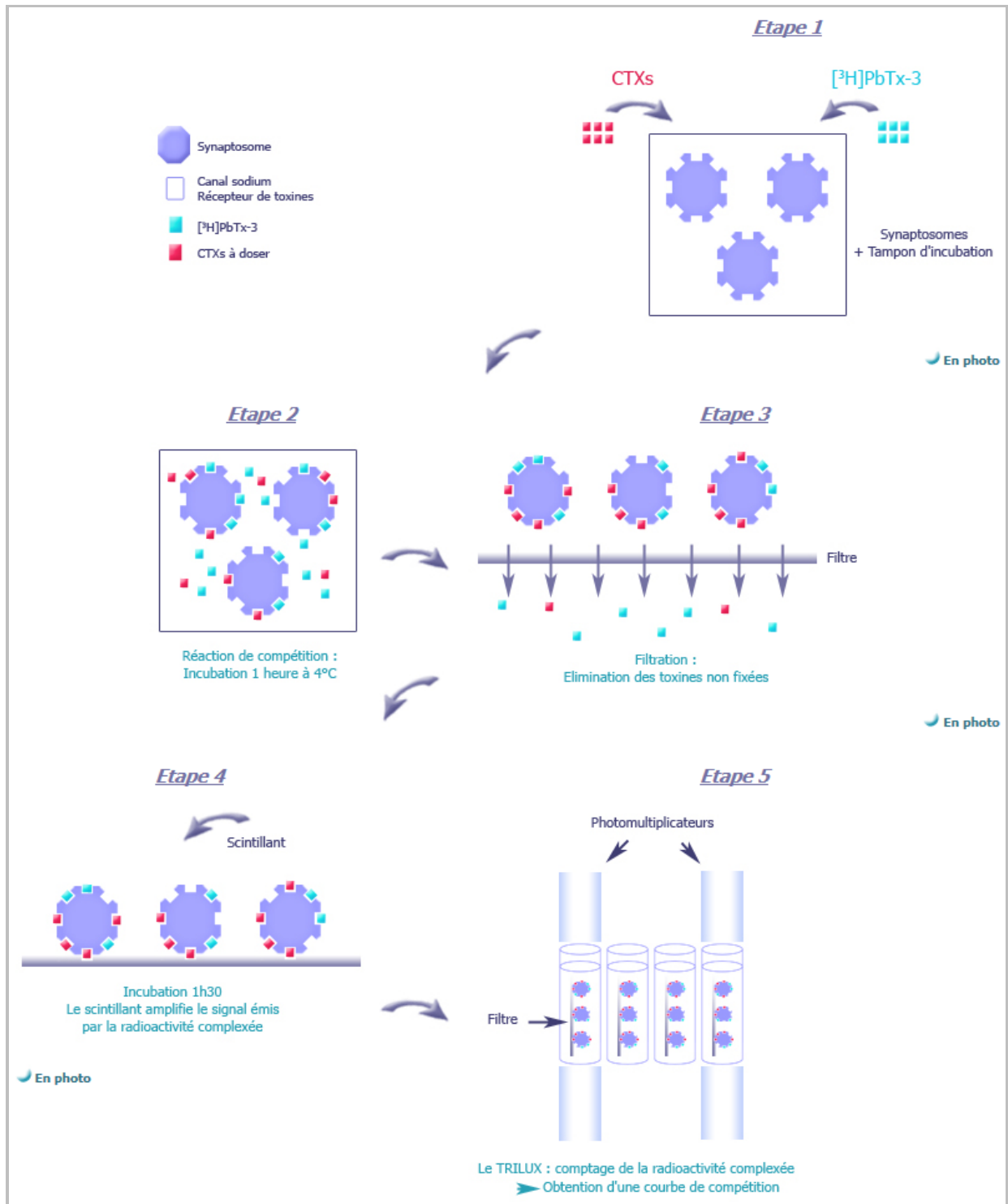
Si on ajoute à ce mélange des concentrations croissantes de molécules inhibitrices non marquées qui entrent en compétition avec le radioligand, la quantité de récepteur disponible va diminuer, ce qui se traduit par une diminution de la quantité de complexe marqué formée. La courbe représentant le pourcentage de complexe formé en fonction de la concentration en inhibiteur (I) en échelle semi-Log est une sigmoïde.



Schémas modifiés d'après Bottein Dechraoui 1999

► **Le test en images**

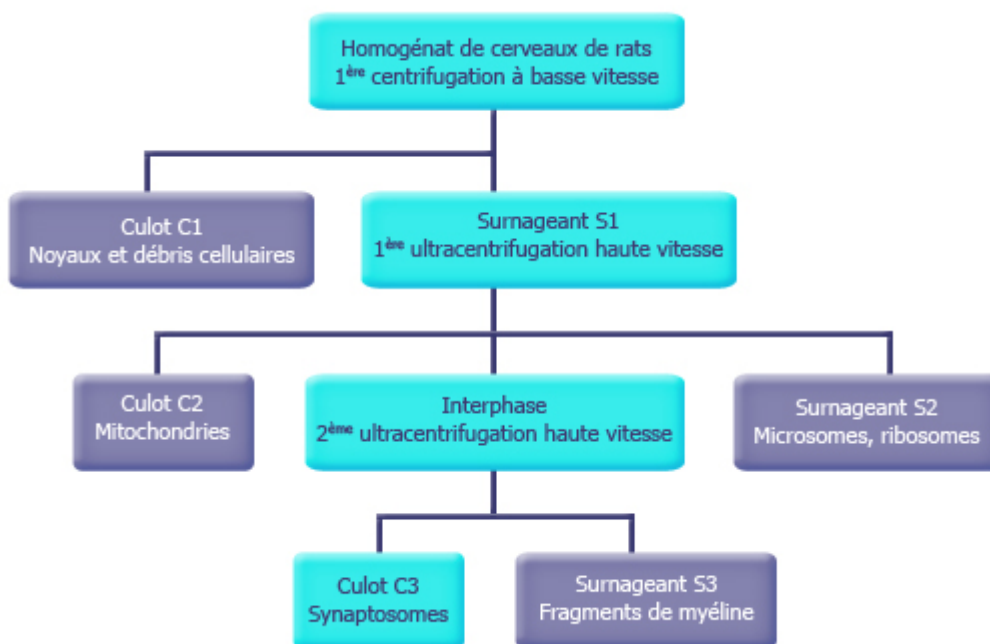
Les différentes étapes de ce test suivent le protocole de Dechraoui et al. (1999).



Obtention et purification des canaux sodium

Actuellement, les canaux sodium sont obtenus à partir de préparations membranaires issues des cellules excitables de cerveaux de rat, appelées aussi synaptosomes, provenant de cerveaux de rat. Le protocole utilisé est basé sur celui de Dodd et al. (1981) dont voici les grandes étapes :

- Commande de cerveaux de rat congelés auprès d'une animalerie agréée ;
- Préparation des homogénats de cerveaux suivie de 3 centrifugations selon le schéma suivant (modifié d'après Bottein Dechraoui 1999) :



- Le dosage en protéines des synaptosomes est réalisé selon la méthode de Bradford, la concentration optimale nécessaire au test de détection se situant entre 60 à 80 mg ml⁻¹ de protéines.

Le test de détection « interaction ligand-récepteur » nécessite l'utilisation d'une toxine radiomarquée : la brevétaxine tritiée, [³H]PbTx-3.

L'utilisation de radioéléments ne s'improvise pas et repose sur l'application des textes émis par l'Union Européenne sous le nom EURATOM. La réglementation et les normes françaises résultent de la transposition de ces textes européens ainsi que des directives de la Commission Internationale de protection radiologique (CIPR).

Annexe 6 : Description détaillée des diverses possibilités de tests immunologiques

Plusieurs équipes dans le monde ont mené des recherches sur l'immunodétection des ciguatoxines : principalement une équipe américaine, l'équipe d'Hokama à l'Université de Hawaï, une équipe japonaise sous la direction actuelle du Pr. Hiram et une équipe française sous la direction du Dr S. Pauillac membre de l'Institut Pasteur à travers un détachement à l'Institut de recherches Louis Malardé à Tahiti de 1992 à 1999 et donc en collaboration avec l'équipe de Tahiti sous la direction actuelle de Mireille Chinain.

C'est historiquement l'équipe d'Hokama qui a lancé les premiers travaux. Ainsi, les premiers anticorps polyclonaux dirigés contre les ciguatoxines ont été produits chez les moutons en 1977 par des injections répétées de complexes ciguatoxines/albumine sérique humaine (ASH) obtenus avec du carbodiimide qui est un agent de couplage chimique toxine à fonction acide native ou acquise-protéine (Hokama et al., 1977). Avec ces anticorps un radio-immunoessai (RIA) a été mis au point (Kimura et al., 1982a, b), puis un essai immunoenzymatique (EIA) (Hokama et al., 1983, 1984). Une méthodologie d'utilisation par fixation sur bâtonnet végétal, le bambou (qui a conduit à l'appellation de « Bamboo stick test »), a été développée pour une utilisation pratique par sondage des chairs de poissons frais afin de détecter la présence éventuelle des ciguatoxines. Les anticorps polyclonaux ont ensuite été remplacés par des anticorps monoclonaux. C'est ainsi que Hokama a décrit l'utilisation d'anticorps monoclonaux produits à partir de conjugués (AO) acide okadaïque-ASH qui présentaient une affinité pour les ciguatoxines égale ou supérieure à celle observée pour l'AO (Hokama et al., 1985, 1988, 1989). Puis d'autres anticorps monoclonaux dirigés directement contre les ciguatoxines par la même méthode ont été produits toujours par l'équipe d'Hokama. Ces différents anticorps étaient détectés par marquage soit avec de la peroxydase (S-EIA pour Solid –Enzyme Immuno Assay) soit avec des particules de latex colorées en bleu (S-PIA pour Solid phase ImmunoAssay) (Hokama et al. 1990, 1992, 1993, 1998a, b).

La phase d'industrialisation a ensuite été mise en route et le premier immuno-test appelé Ciguatect® a été commercialisé par la Hawaï Chemtect International, Pasadena, USA. Puis après une phase d'évaluation et de reprise de la société ci-dessus un nouveau test, le Cigua-Check®, basé sur le même principe d'analyse a été commercialisé par la société hawaïenne Oceanit Laboratories. C'est le Dr Park qui a débuté la promotion de la production et de la commercialisation de ces tests (Park, 1994). Le principe en est le suivant : dans un premier temps les ciguatoxines pisciaires éventuelles sont adsorbées sur une palette de bambou recouverte d'un enduit correcteur (qui joue le rôle d'adsorbant non spécifique style acide silicique ou florasil) par simple sondage embrochage répété de cette palette dans les chairs du poisson. Après séchage et fixation rapide dans le méthanol, la palette est immergée dans une suspension d'anticorps marqués au latex bleu. Après rinçage, la palette se colore plus ou moins en bleu en fonction de la quantité d'anticorps adsorbés sur les ciguatoxines retenues sur la palette. Les contrôles positifs et négatifs doivent être faits. Mais ce test présente jusqu'à 25% de faux négatifs ce qui n'est pas en faveur de son utilisation sans validation scientifique normalisée (Dickey et al., 1994). D'ailleurs comme il est présenté être capable de détecter AO et CTXs on n'a jamais pu savoir à l'époque quel était le type d'anticorps utilisé sachant qu'il est beaucoup plus facile de préparer des Ac anti AO (qui a une fonction acide) que anti CTXs (sans fonction acide) puisque l'AO était facilement disponible en quantité importante alors que les ciguatoxines sont disponibles en quantité limitée souvent inférieure à 1 mg ! Il semblerait aussi que les anticorps monoclonaux utilisés provenaient d'une sélection de ceux synthétisés par la population d'hybridomes 5C8 obtenus en 1986 (ce qui nous ramène bien à ceux ciblant l'acide okadaïque) suite aux données publiées par Hokama pour la réalisation de la méthode AOAC quant à la composition en anticorps des solutions fournies dans le Cigua-Check® (Hokama et al., 1998a, b). Malheureusement, la confirmation de la non validité relative de ce test a été faite par Legrand et al., en 1998, et par Richard Lewis (Lehane et Lewis, 2000) avec même en plus l'absence de réaction avec la C-CTX-1 purifiée (Vernoux communication personnelle). C'est alors qu'a été indiqué qu'il y avait peu de chance que des anticorps préparés contre des P-CTXs réagissent pleinement avec les C-CTXs compte tenu des épitopes terminaux très différents (Pottier et al., 2001). Le produit est cependant resté commercialisé aussi bien pour

les poissons des Antilles que pour les poissons de l'océan Pacifique jusqu'en 2005 date à laquelle il a été retiré du marché (http://cigua.com/OnLineStore/product_info.php?cPath=24&products_id=29 ; aller à la dernière page). A la même date l'équipe d'Hokama a indiqué avoir amélioré la spécificité de ses anticorps et il a été annoncé que leur essai « Bamboo stick test » permettait de détecter les P-CTXs et les C-CTXs à de très faibles niveaux de 0,078 à 5 ng ml⁻¹ avec aucune réaction croisée pour l'AO, la palytoxine et l'acide domoïque (Campora et al., 2006). Cependant, aucune réapparition de ce test au niveau commercial n'a suivi [d'ailleurs, récemment ce test a été encore critiqué et son bien fondé mis en doute (Bienfang et al., 2011)]. Néanmoins la réponse de C.E. Campora de la Société Oceanit a été encore virulente (Ebesu et Campora, 2012). En réalité la voie suivie jusque là par l'équipe d'Hokama a été modifiée et on est passé à la méthode ELISA Sandwich (voir le principe ci-après avec le focus sur le travail des équipes japonaises car ce sont eux qui l'ont mis au point) qui montre une bonne corrélation avec le test sur neuroblastome 2A (Campora et al., 2008). Pour cette méthode ELISA sandwich, Campora et al., (2008) ont utilisés des anticorps de capture anti-cycles initiaux ABCD des P-CTXs produits chez le poulet (Ig Y) ainsi qu'un anticorps réactionnel monoclonal (IgG) chez la souris dirigé contre le fragment terminal JKLM déjà mentionné et conjugué à la HRP (horse radish peroxydase). La technique de détection CIEA (ELISA par inhibition compétitive) conduit à une LD (limite de détection) d'environ 5 pg mL⁻¹ d'équivalent CTX par mg d'extrait (correspondant à 5 × 10⁻¹² M), qui est du même ordre que celle du test sur neuroblastomes. De plus cet essai CIEA fournit des résultats qui se tiennent lorsqu'on les compare à ceux obtenus par extraction de la chair de poisson capturés *in natura* ou bien élevé en aquaculture (Campora et al., 2008, 2010).

Les équipes françaises et japonaises ont travaillé en collaboration et ont adopté des démarches scientifiques totalement différentes et complémentaires pour essayer de résoudre le problème de l'immunodétection des ciguatoxines qui à lui seul est un cas d'école car on se trouve en présence de quatre freins majeurs : des quantités de ciguatoxines utilisables très faibles (<1mg), une très forte toxicité, une variabilité structurale et épitopique, une faible masse (à peine supérieure à 1000 Da) qui en fait des haptènes non directement immunogéniques qui nécessitent donc un couplage toxine-protéine. Cela veut dire que pour rester dans les contraintes de quantité on ne peut préparer que des anticorps monoclonaux puisque ceux-ci nécessitent des quantités de toxines faibles sur petit animal de laboratoire comme le rat ou la souris et cela permet alors une production illimitée d'anticorps monoclonaux au contraire de celle des polyclonaux qui nécessite beaucoup d'antigène à injecter sur un gros animal comme le mouton, la chèvre ou le cheval. Au sujet de la variabilité épitopique il faudrait être capable de préparer différents anticorps monoclonaux et les commercialiser en mélange mais on en est très loin jusqu'à maintenant. Et au sujet du couplage toxine –protéine il faut être capable de miniaturiser les techniques afin de pouvoir faire des anticorps malgré les quantités de toxines disponibles absolument infimes.

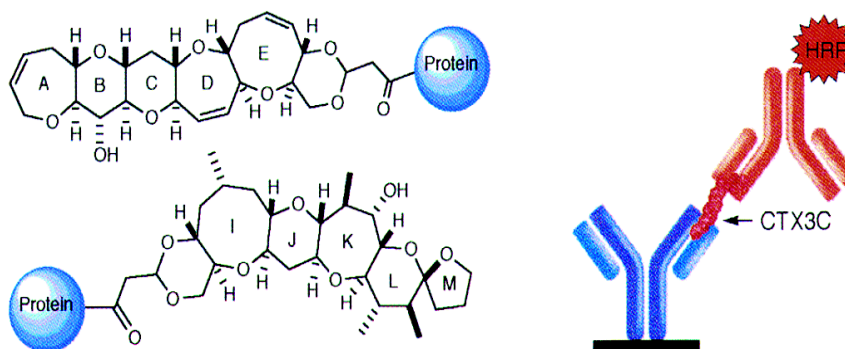
C'est ainsi que l'équipe de Serge Pauillac s'est inscrite dans cette problématique (Pauillac et al., 1995) puisqu'elle ne disposait à cette date là que d'à peine 1mg de P-CTX1B. Afin de ne pas gaspiller ce stock de toxine toute une démarche de miniaturisation des techniques de couplage toxine-protéine sur d'autres molécules modèles disponibles commercialement en quantité suffisante, l'acide acétyl benzoïque, l'hémisucinate de cholestérol puis la brévétaxine PbTx-3 de type PbTx2 (qui agit donc elle aussi sur le site 5 des CSDP).a été réalisée (Pauillac et al., 1998 ; Naar et al., 1998, 1999) La transformation de 400 µg de PbTx-3 en son dérivé mono-succinylé a été effectuée avec un rendement de 100% et a permis une conjugaison avec l'ASH (albumine sérique humaine) ainsi que la préparation d'anticorps spécifiques (Naar et al., 2001). L'utilisation d'un fragment synthétique de la P-CTX-1, le fragment JKLM a aussi été décrite dans ce cadre là et ce avec l'aide de collègues japonais qui ont fourni le fragment.

Au niveau des équipes japonaises, le problème du manque de CTXs pures est annoncé comme pouvant être contourné par la préparation de conjugué protéines avec des haptènes de type fragment terminal JKLM de la CTX-1 et ce dès 1994 (Sasaki et al., 1994). Un dérivé carboxylique avec ce fragment de la CTX-1, a ainsi été préparé avec l'albumine sérique bovine (BSA) et de l'ovalbumine (OVA) et ce, respectivement, à des fins d'immunisation et d'évaluation des réponses de production d'anticorps (Pauillac et al., 2000). Dans cette étude, des conjugués sont préparés avec 3 à 5 mg of haptène en utilisant un ester activé dans un milieu semi-organique (Bulk

activated ester method) ou avec une microtechnique (300 µg of haptène) via la formation d'un anhydride mixte dans un milieu micellaire reverse. Les deux méthodes de couplage fournissent des densités d'épitopes du même ordre de grandeur: 20 et 12 pour le conjugués BSA et OVA, respectivement. Le suivi de la réponse de production d'anticorps monoclonaux Mabs ou de ceux de la production d'anticorps polyclonaux PAb chez la souris a montré qu'un protocole d'immunisation à long terme (injections espacées par 4 semaines d'intervalle) était plus efficace qu'un protocole d'immunisation à court terme (injections espacées de deux semaines). Avec la détection en mode CIEA les PABs long terme ont une plus forte affinité ($KD = 7 \times 10^{-9}$ M), associée à une spécificité étroite, tandis que les PABs court terme ont une affinité plus basse (10 fois moins) mais une plus forte immunoréactivité pour le fragment JKLM des congénères de CTXs qui le possède. Aucune réaction croisée n'est observée pour la PbTx-3, l'OA, la monensine, ou pour d'autres polyethers. Afin de renforcer la sensibilité de cet essai, un système d'amplification biotine-avidine peut être utilisé ce qui abaisse la LD pour le fragment JKLM à 1.23×10^{-9} M. Les développements et applications ultérieures de ces immunoessais ont été poursuivis (Pauillac et al., 2002) et leur évolution rapportée en 2010 dans l'article de Caillaud et collaborateurs (2010).

Au niveau japonais, l'équipe d'Hirama s'est intéressée dès le début des années 1990 par la synthèse des ciguatoxines afin de pouvoir en produire des quantités appréciables et aussi pour le challenge de la réussite de la synthèse de structures aussi complexe que celle de tels polyéthers qui sont l'œuvre unique de divers dinoflagellés (Hirama et al., 2001 ; Inoue et al., 2002, 2004, 2006 a et b). Le travail fondateur de l'approche immunologique actuelle, celle de la technique ELISA sandwich directe, est celui de Oguri et al., en 2003 et il est rapporté dans l'abstract joint ci-après.

Abstract de « Synthesis-based approach toward direct sandwich immunoassay for ciguatoxin CTX-3C (Oguri et al., en 2003)



Ciguatoxins are the major causative toxins of ciguatera seafood poisoning. Limited availability of ciguatoxins has hampered the development of a reliable and specific immunoassay for detecting these toxins in contaminated fish. Monoclonal antibodies (mAbs) specific against both ends of ciguatoxin CTX-3C were prepared by immunization of mice with protein conjugates of rationally designed synthetic haptens, **3** and **4**, in place of the natural toxin. Haptenic groups that possess a surface area larger than 400 \AA^2 were required to produce mAbs that can bind strongly to CTX-3C itself. A direct sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using these mAbs was established to detect CTX-3C at the ppb level with no cross-reactivity against other related marine toxins, including brevetoxin A, brevetoxin B, okadaic acid, or maitotoxin.

Ces deux fragments pentacycliques correspondant aux deux parties terminales de la CTX-3C (nommé ABCDE et IJKLM) ont ainsi été couplés avec de l'hémocyanine de keyhole limpet (KLH) et de BSA. Après immunisation de la souris avec les deux KLH conjugués, plusieurs anticorps MAbs ont été produits. Deux ont été sélectionnés à cause de leur très forte réactivité envers leur fragment cyclique correspondant et aussi envers la CTX-3C, et aussi à cause de leur absence de réaction croisée vis-à-vis des fragments cycliques non correspondant ainsi que vis-à-vis des autres biotoxines marines structurellement reliées comme l'OA, les congénères de PbTxs et la maitotoxine (MTX). Et donc un ELISA sandwich direct basé sur l'utilisation de l'anticorps monoclonal de capture sélectionné c'est-à-dire le MAb 10C9 ($KD = 2.8 \times 10^{-9}$ M pour ABCDE) et sur le MAb 3D11 de détection de l'autre extrémité ($KD = 1.22 \times 10^{-7}$ M for IJKLM) conjugué à la peroxydase de raifort (HRP pour Horse radish peroxydase) a été proposé comme méthode de

référence avec une LOD de 5 nM pour la détection de la CTX-3C. Les auteurs concluent à juste titre que cette stratégie doit pouvoir être généralisable à tous les congénères CTXs. Cette hypothèse s'est révélée exacte puisque 3 années plus tard, la production de MAb contre les cycles communs et terminaux de la CTX-1 and de la 51-hydroxyCTX-3C a été possible en utilisant un conjugué protéique KLH du fragment synthétique HIJKLM (Tsumuraya et al., 2006). Le MAb 8H4 a été retenu car très réactif pour capturer le fragment droit terminal de la 51-hydroxyCTX-3C ($KD = 7.5 \times 10^{-8}$ M). Il est aussi parfaitement discriminant puisqu'il distingue les composés qui contiennent de ceux qui ne contiennent pas la fonction hydroxyle OH en position 51 (l'OH-51). Et comme précédemment une méthode ELISA sandwich directe avec comme anticorps de capture les MAb 10C9 ($KD = 2.8 \times 10^{-9}$ M pour le fragment cyclique de l'extrémité de gauche de la CTX-3C et de la 51-hydroxy CTX-3C) et comme nouvel anticorps détecteur le MAb 8H4 ($KD = 7.5 \times 10^{-8}$ M pour la partie cyclique de l'extrémité droite de la 51-hydroxyCTX-3C) conjugué à la HRP. Une LOD de seulement 1 nM pour la 51-hydroxyCTX-3C est alors obtenu. Finalement, plus récemment, Tsumuraya et ses collaborateurs (Tsumuraya et al., 2010) ont réutilisé le clone MAb 10C9 pour la capture (dirigé contre la partie gauche de la CTX-3C) avec pour la détection un autre anticorps monoclonal le MAb 3D11 ($KD = 1.22 \times 10^{-7}$ M pour la partie droite terminale de la CTX-3C), et obtenu une LD de 5 nM pour la CTX-3C. De plus une autre approche décrite par le groupe d'Hirama consiste en la production d'anticorps recombinant (rFabs) pour la partie anti fragment ABCD (Nagumo et al., 2004). Le principe est basé sur la déduction que l'épitope reconnu par les MAbs anti CTX englobe plus que 3 cycles, et les MAbs de souris amenés sous forme de conjugués ABC-KLH ont été génétiquement modifié à l'aide d'une phage-displayed Abs technology. Lors de l'étude CIEA, les trois rFabs soigneusement sélectionnés donnent des valeurs de KD pour les fragments libres ABCD allant de 2.4×10^{-5} M à 5.0×10^{-5} M. De plus, le rFab 1C49, qui a la plus forte réactivité pour ABCD, peut aussi réagir avec la CTX-3C, quoique à un niveau plus faible. Ce type d'expérimentations et d'autres études (Tsumoto et al., 2008 ; Ui et al., 2008 ; Tsumaraya et al., 2010) ont confirmé l'importance de l'utilisation de fragments ayant plus de 4 cycles en tant qu'haptènes synthétiques pour fabriquer des conjugués haptènes-protéines afin de produire des MAbs anti congénère de CTX de forte affinité et spécificité. L'utilisation d'anticorps combinés monoclonaux de type Mabs 10C9 et 3D11 (contre respectivement la partie gauche et droite de la CTX-3C) permet effectivement une neutralisation préventive *in vivo* d'une intoxication chez la souris (Inoue et al., 2009).

Il y a donc actuellement des anticorps existant avec une technique ELISA sandwich prometteuse dont le principe a même été utilisé par l'équipe d'Hokama comme rapporté plus haut (Campora et al., 2008, 2010) mais restent les problèmes de la diversité des ciguatoxines et de la polyvalence nécessaire des anticorps.

Annexe 7 : Suivi de l'actualisation du rapport

Date	Version	Page	Description de la modification (<i>en bleu, italique</i>)
24/11/2014	03	01	<p><u>Texte du 25 juillet 2014</u> Juillet 2014 <u>Texte révisé</u> <i>Novembre 2014</i></p>
24/11/2014	03	02	<p><u>Texte du 25 juillet 2014</u> Rapport : 26 juin 2014 • version : 1 <u>Texte révisé</u> Rapport : <i>24 novembre 2014</i> • version : 3</p>
24/11/2014	03	36 et 45	<p><u>Texte du 25 juillet 2014</u> L'analyse d'un échantillon de chair, d'un échantillon d'œsophage et de trois échantillons d'aileron séché par test de cytotoxicité sur cellules Neuro-2a a conclu à la présence de toxines de type ciguatoxines, dont les concentrations estimées sont les suivantes :</p> <ul style="list-style-type: none"> - chair : 0,144 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ (soit 14 fois la limite la concentration considérée sans risque pour l'Homme) ; - œsophage : 114 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ (soit 11 400 fois la concentration considérée sans risque pour l'Homme) ; - aileron séché : 0,145 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ ; 0,158 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ ; 0,737 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ (soit 14 à 74 fois la concentration considérée sans risque pour l'Homme). <p><u>Texte révisé</u> L'analyse d'un échantillon de chair, d'un échantillon d'<i>estomac</i> et de trois échantillons d'aileron séché par test de cytotoxicité sur cellules Neuro-2a a conclu à la présence de toxines de type ciguatoxines, dont les concentrations estimées sont les suivantes :</p> <ul style="list-style-type: none"> - chair : 0,144 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ (soit 14 fois la limite la concentration considérée sans risque pour l'Homme) ; - <i>estomac</i> : 114 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ (soit 11 400 fois la concentration considérée sans risque pour l'Homme) ; - aileron séché : 0,145 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ ; 0,158 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ ; 0,737 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ (soit 14 à 74 fois la concentration considérée sans risque pour l'Homme).
25/07/2014	02	01	<p><u>Texte du 26 juin 2014</u> Juin 2014 <u>Texte révisé</u> <i>Juillet 2014</i></p>
25/07/2014	02	02	<p><u>Texte du 26 juin 2014</u> Rapport : 26 juin 2014 • version : 1 <u>Texte révisé</u> Rapport : <i>25 juillet 2014</i> • version : 2</p>
25/07/2014	02	03	<p><u>Texte du 26 juin 2014</u> Les travaux, objets du présent rapport, ont été suivis et adoptés par le CES suivant :</p> <p>CES ERCA « Evaluation des risques physico-chimiques dans les aliments » – en réunions plénières du 19 novembre 2013, 17 mars 2014, 14 avril 2014, 26 juin 2014 et par voie télématique le 3 juillet</p>

			<p>2014.</p> <p>Texte révisé</p> <p>Les travaux, objets du présent rapport, ont été suivis et adoptés par le CES suivant :</p> <p>CES ERCA « Evaluation des risques physico-chimiques dans les aliments » – en réunions plénières du 19 novembre 2013, 17 mars 2014, 14 avril 2014, 26 juin 2014 et par voie télématique le 3 juillet 2014. <i>Une mise à jour des travaux a été adoptée par le président du CES ERCA par voie télématique le 25 juillet 2014, suite à la réception d'informations complémentaires le 21 juillet 2014.</i></p>
25/07/2014	02	36	<p>Texte du 26 juin 2014</p> <p>Au regard des éléments présentés précédemment dans le rapport, même si le bio-essai sur souris a fourni un résultat négatif pour les 24 échantillons de chair de requins analysés, il n'est pas possible de conclure avec certitude que ces échantillons ne sont pas contaminés par des toxines à des niveaux qui pourraient présenter un risque pour la santé du consommateur.</p> <p>Des analyses complémentaires par test de cytotoxicité sur cellules Neuro-2a et/ou un test sur récepteur, ainsi que par LC-MS/MS permettraient d'acquérir les données nécessaires.</p> <p>L'Anses a donc engagé une convention de recherche et de développement (CRD) avec l'Arvam (Agence pour la recherche et la valorisation marines, La Réunion), en collaboration avec l'IRTA (Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentaria, Espagne) afin que les échantillons de chair de requins réunionnais soient analysés par test de cytotoxicité sur cellules Neuro-2a.</p> <p>Les résultats préliminaires obtenus sur les 24 échantillons de chair de requins réunionnais n'ont pas révélé de toxicité dans ce test aux doses testées.</p> <p>La CRD incluait également des échantillons du requin impliqué dans un foyer d'intoxications survenu à Madagascar en novembre 2013 (124 personnes intoxiquées dont 9 sont décédées) afin qu'ils soient analysés par bio-essai sur souris et par test de cytotoxicité sur cellules Neuro-2a. L'analyse génétique a permis de conclure qu'il s'agissait d'un requin bouledogue. L'échantillon de chair a donné un résultat positif par bio-essai sur souris, les premiers résultats obtenus sur cellules Neuro-2a ne sont pas encore interprétables. Les symptômes observés chez les souris (prostration, dyspnée, cyanose, convulsions et mortalité par arrêt respiratoire) sont typiques de ceux connus pour les carchatoxines (Boisier et al., 1995). Trois échantillons d'aile et un d'œsophage ont aussi été testés sur cellules Neuro-2a et les premiers résultats montrent une activité de type ciguatoxines dans ces échantillons, particulièrement puissante dans l'échantillon d'œsophage. Ces résultats préliminaires sont en cours de confirmation.</p> <p>Texte révisé</p> <p>Au regard des éléments présentés précédemment dans le rapport, même si le bio-essai sur souris a fourni un résultat négatif pour les 24 échantillons de chair de requins analysés, il n'est pas possible de conclure avec certitude que ces échantillons ne sont pas contaminés par des toxines à des niveaux qui pourraient présenter un risque pour la santé du consommateur. <i>En effet, ce test n'est pas suffisamment sensible pour détecter des concentrations de ciguatoxines considérées sans risque pour l'Homme.</i></p> <p>Des analyses complémentaires par test de cytotoxicité sur cellules Neuro-2a et/ou un test sur récepteur, ainsi que par LC-MS/MS permettraient d'acquérir les données nécessaires.</p>

			<p>L'Anses a donc engagé une convention de recherche et de développement (CRD) avec l'Arvam (Agence pour la recherche et la valorisation marines, La Réunion), en collaboration avec l'IRTA (Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentaria, Espagne) afin que les échantillons de chair de requins réunionnais soient analysés par test de cytotoxicité sur cellules Neuro-2a. <i>Le rapport final a été transmis à l'Anses le 21 juillet 2014.</i></p> <p><i>Les résultats n'ont pas montré de présence de toxines de type ciguatoxines au-delà de la limite de détection de 0,04 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ de chair. Il convient de noter que cette limite de détection est supérieure à la concentration considérée sans risque pour l'Homme de 0,01 µg eq. P-CTX-1 kg⁻¹ de chair de poisson (EFSA, 2010 ; US-FDA, 2011). Cette limite de détection élevée est principalement due à la matrice, ce type d'échantillon étant étudié pour la première fois dans le laboratoire.</i></p> <p>La CRD incluait également des échantillons du requin impliqué dans un foyer d'intoxications survenu à Madagascar en novembre 2013 (124 personnes intoxiquées dont 9 sont décédées) afin qu'ils soient analysés par bio-essai sur souris et par test de cytotoxicité sur cellules Neuro-2a. L'analyse génétique a permis de conclure qu'il s'agissait d'un requin bouledogue. L'échantillon de chair a donné un résultat positif par bio-essai sur souris, avec des symptômes (prostration, dyspnée, cyanose, convulsions et mortalité par arrêt respiratoire) typiques de ceux connus pour les carchatoxines (Boisier et al., 1995). <i>L'analyse d'un échantillon de chair, d'un échantillon d'œsophage et de trois échantillons d'aileron séché par test de cytotoxicité sur cellules Neuro-2a a conclu à la présence de toxines de type ciguatoxines, dont les concentrations estimées sont les suivantes :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>chair : 0,144 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ (soit 14 fois la limite la concentration considérée sans risque pour l'Homme) ;</i> - <i>œsophage : 114 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ (soit 11 400 fois la concentration considérée sans risque pour l'Homme) ;</i> - <i>aileron séché : 0,145 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ ; 0,158 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ ; 0,737 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ (soit 14 à 74 fois la concentration considérée sans risque pour l'Homme).</i>
25/07/2014	02	45	<p>Texte du 26 juin 2014</p> <p>L'Anses a donc engagé une convention de recherche et de développement (CRD) avec l'Arvam (en collaboration avec l'IRTA) afin que ces échantillons soient analysés par test de cytotoxicité sur cellules Neuro-2a.</p> <p>Les résultats préliminaires obtenus sur les 24 échantillons de chair de requins réunionnais n'ont pas révélé de toxicité dans ce test aux doses testées.</p> <p>La CRD incluait également des échantillons du requin bouledogue impliqué dans un foyer d'intoxications survenu à Madagascar en novembre 2013 (124 personnes intoxiquées dont 9 sont décédées) afin qu'ils soient analysés par bio-essai sur souris et par test de cytotoxicité sur cellules Neuro-2a. L'échantillon de chair a donné un résultat positif par bio-essai sur souris, les premiers résultats obtenus sur cellules Neuro-2a ne sont pas encore interprétables. Les symptômes observés chez les souris (prostration, dyspnée, cyanose, convulsions et mortalité par arrêt respiratoire) sont typiques de ceux connus pour les carchatoxines (Boisier et al., 1995). Trois échantillons d'aileron et un d'œsophage ont aussi été testés sur cellules Neuro-2a et les premiers résultats montrent une activité de type ciguatoxines dans ces échantillons, particulièrement puissante dans l'échantillon d'œsophage. Ces résultats préliminaires sont en</p>

			<p>cours de confirmation.</p> <p>Texte révisé</p> <p>L'Anses a donc engagé une convention de recherche et de développement (CRD) avec l'Arvam (en collaboration avec l'IRTA) afin que ces échantillons soient analysés par test de cytotoxicité sur cellules Neuro-2a. <i>Le rapport final a été transmis à l'Anses le 21 juillet 2014.</i></p> <p><i>Les résultats n'ont pas montré la présence de toxines de type ciguatoxines au-delà de la limite de détection de 0,04 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ de chair. Il convient de noter que cette limite de détection est supérieure à la concentration considérée sans risque pour l'Homme de 0,01 µg eq. P-CTX-1 kg⁻¹ de chair de poisson.</i></p> <p>La CRD incluait également des échantillons du requin bouledogue impliqué dans un foyer d'intoxications survenu à Madagascar en novembre 2013 (124 personnes intoxiquées dont 9 sont décédées) afin qu'ils soient analysés par bio-essai sur souris et par test de cytotoxicité sur cellules Neuro-2a. L'échantillon de chair a donné un résultat positif par bio-essai sur souris, avec des symptômes (prostration, dyspnée, cyanose, convulsions et mortalité par arrêt respiratoire) typiques de ceux connus pour les carchatoxines (Boisier et al., 1995). <i>L'analyse d'un échantillon de chair, d'un échantillon d'œsophage et de trois échantillons d'aileron séché par test de cytotoxicité sur cellules Neuro-2a a conclu à la présence de toxines de type ciguatoxines, dont les concentrations estimées sont les suivantes :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>chair : 0,144 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ (soit 14 fois la limite la concentration considérée sans risque pour l'Homme) ;</i> - <i>œsophage : 114 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ (soit 11 400 fois la concentration considérée sans risque pour l'Homme) ;</i> - <i>aileron séché : 0,145 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ ; 0,158 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ ; 0,737 µg eq P-CTX-1 kg⁻¹ (soit 14 à 74 fois la concentration considérée sans risque pour l'Homme).</i>
25/07/2014	02	46	<p>Texte du 26 juin 2014</p> <p>Date de validation du rapport d'expertise collective par le groupe de travail : le 26 juin 2014</p> <p>Texte révisé</p> <p>Date de validation du rapport d'expertise collective par le groupe de travail : le <i>25 juillet 2014</i></p>

Notes





Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail
14 rue Pierre et Marie Curie
94701 Maisons-Alfort Cedex
www.anses.fr