anses

Valeurs toxicologiques
de référence

La palytoxine

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective

Juin 2023

Connaître, évaluer, protéger

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 1er juin 2023

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

relatif à l'élaboration de VTR pour la palytoxine (CAS n° 77734-91-9)

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.
L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.
Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part à l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.
Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).
Ses avis sont publiés sur son site internet.

L'Anses a été saisie le 3 décembre 2021 par Direction générale de la santé (DGS) et la Direction générale de l'alimentation (DGAL) pour la réalisation de l'expertise suivante : demande d'avis relatif aux risques pour la santé humaine liés à la prolifération d'*Ostreopsis* spp. sur le littoral basque.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Au cours des dernières décennies, les dinoflagellés (eucaryotes unicellulaires) du genre *Ostreopsis* ont été identifiés dans les zones côtières de plusieurs pays (Accoroni et Totti 2016; Aligizaki *et al.,* 2008; Amzil *et al.,* 2012; Ciminiello *et al.,* 2006; Del Favero *et al.,* 2012; Fraga *et al.,* 2017; Funari, Manganelli et Testai 2015; Santos *et al.,* 2019). Ces microalgues benthiques peuvent causer des intoxications humaines lorsqu'elles sont présentes dans les embruns, l'eau de mer (Patocka *et al.* 2018 ; Walsh 2017). L'exposition peut se faire par voie respiratoire (contact avec les embruns lors de promenade, de surveillance des plages, des activités de baignade et nautiques, *etc*.), par contact cutané avec de l'eau de mer ou des macroalgues (lors des activités de baignade et/ou nautiques) ou encore par ingestion (d'eau de mer lors de la baignade, pratique d'activité nautique ou en cas de consommation de produits de la mer contaminés par des toxines produites par *Ostreopsis* spp). Des

manifestations cliniques telles que toux, rhinorrhée, irritations de la sphère ORL et des yeux, céphalées, fièvre, difficultés respiratoires, nausées, vomissements, diarrhées, douleurs abdominales, myalgies, rougeurs ou démangeaisons sont alors observées chez les personnes exposées à *Ostreopsis* (Berdalet *et al.,* 2022). Certains rapports de cas font aussi état de troubles cardiovasculaires (Hoffmann *et al*., 2008 ; Deeds *et al*., 2010 ; Wu *et al*., 2014).

Les proliférations d'*Ostreopsis* sont aussi liées à des mortalités massives de certains invertébrés (Sansoni *et al*., 2003 ; Totti *et al*., 2010 ; Ciminiello *et al*., 2006, 2012, 2014). Les toxines produites par *Ostreopsis* ont été détectées dans une grande diversité de produits de la mer (Aligizaki *et al*., 2008 ; Bire *et al*, 2013, 2015 ; Brissard *et al*., 2014 ; EFSA 2009) issus de la mer Méditerranée et peuvent présenter par conséquent un risque potentiel d'intoxication alimentaire chez l'Homme.

En France, la présence d'*Ostreopsis* est observée de façon récurrente sur les côtes méditerranéennes depuis 2005 (observations de l'Ifremer dans le cadre du Réseau d'Observation et de Surveillance du Phytoplancton et de l'Hydrologie dans les eaux littorales ou Rephy). Durant l'été 2021, un épisode important de prolifération d'*Ostreopsis* a également été signalé sur la côte basque de fin juillet à fin septembre 2021. Ce sont près de 800 personnes[1] qui ont présenté des symptômes d'intoxication après avoir fréquenté des plages de ces côtes (Paradis et Labadie, 2022). Quelques cas d'intoxications similaires avaient déjà été signalés pendant l'été 2020. Il est donc possible que ce phénomène émergent devienne récurrent et puisse s'amplifier sur la côte atlantique.

Les premières investigations menées par l'Ifremer ont mis en évidence la présence de deux espèces de microalgues du genre *Ostreopsis* : *O*. cf. *siamensis* et *O*. cf. *ovata* (Amzil *et al.,* 2021). Si *O*. cf. *siamensis* est observée dans la zone depuis 2018, la détection d'*O*. cf. *ovata* dans cette partie du golfe de Gascogne est une nouveauté sachant que la prolifération de cette espèce est connue pour provoquer des troubles à l'exemple de ceux observés depuis les années 2000 en Méditerranée.

O. cf. *ovata* est connue pour produire des toxines du groupe de la palytoxine (PLTX), principalement des ovatoxines (Amzil *et al.,* 2012 ; Brissard *et al.,* 2015 ; Ciminiello *et al.,* 2008 ; Ciminiello *et al.,* 2012 ; Ciminiello *et al.,* 2010 ; García-Altares *et al.,* 2015 ; Gemin 2020 ; Tartaglione *et al.,* 2017). Ces molécules pourraient être à l'origine des symptômes observés chez l'Homme (Illoul *et al.,* 2012; Tichadou *et al.,* 2010), d'autant plus que certaines d'entre elles ont été détectées dans les aérosols (Ciminiello *et al.,* 2014 ; Medina-Pérez *et al.,* 2021).

La DGS et la DGAL ont saisi l'Anses le 3 décembre 2021 pour une demande d'avis relatif aux risques pour la santé humaine liés à la prolifération d'*Ostreopsis* spp. sur l'ensemble du littoral français. L'Agence a redéfini le périmètre et le titre de la saisine afin de se focaliser sur les risques liés aux proliférations d'*Ostreopsis* sur le littoral basque. L'objectif de cette saisine est, d'une part, la mise à jour des connaissances relatives aux microalgues du genre *Ostreopsis* pour lesquelles l'Agence avait déjà rendu deux avis en 2007 et 2008 (Afssa, 2007; 2008) et, d'autre part, l'établissement de recommandations spécifiques à la côte atlantique ainsi que, si cela s'avère opportun, la mise à jour des recommandations spécifiques à la côte méditerranéenne établies en 2007 et 2008.

Dans le cadre du contrat d'expertise établi le 20 décembre 2021, les questions de la saisine ont été reformulées par l'Anses selon deux axes : le premier concerne le bilan des connaissances et le second l'élaboration de recommandations dont la proposition de valeurs

[1] Nombre de cas recensés par le centre antipoison (CAP) de Bordeaux fin septembre 2021

toxicologiques de référence (VTR) court et moyen terme pour les voies orale, respiratoire et cutanée pour la toxine de référence. Le présent avis traite uniquement de la toxicité de la PLTX et de la sélection ou construction de VTR court et moyen terme pour les voies orale, respiratoire et cutanée.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'Anses a confié l'instruction de cette saisine au groupe de travail (GT) « *Ostreopsis* » rattaché au comité d'experts spécialisé (CES) « Eaux ».

Le CES « Valeurs sanitaires de référence » (VSR) a été mandaté pour proposer des VTR par voies orale, respiratoire et cutanée pour la PLTX. Des rapporteurs ont été nommés pour analyser les données sur la toxicité de la substance. Les travaux d'expertise ont été soumis au CES VSR tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques et ont été validés en séance du 9 mars 2023. Le rapport tient compte des observations et des 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) ».

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES VSR

3.1. Informations générales sur la palytoxine

La PLTX a été isolée pour la première fois en 1971 à partir du cnidaire hexacoralliaire *Palythoa toxica* (corail tropical) (Moore et Scheuer, 1971). La PLTX et ses analogues seraient synthétisés par des bactéries (Moore, Helfrich et Patterson, 1982 ; Seemann *et al.,* 2009) ou des microalgues symbiotes du corail *Palythoa* (Maeda *et al*., 1985). Par ailleurs, la PLTX et la 42-hydroxy-PLTX ont été détectées chez *Trichodesmium sp.*, une cyanobactérie marine tropicale (Kerbrat *et al.*, 2011).

Les propriétés physico-chimiques sont indiquées dans le rapport.

3.2. Synthèse des données toxicologiques

La toxicité de la PLTX a été étudiée chez de nombreuses espèces animales (très majoritairement rongeurs, mais également lagomorphes, chiens, singes) et cela pour plusieurs voies d'administration. Les données disponibles dans la littérature sont hétérogènes en raison des différentes méthodologies employées, de l'origine de la PLTX et des différences de souche génétique, de sexe et d'âge des animaux utilisés. La cinétique d'apparition, la nature et l'intensité des symptômes diffèrent en fonction des voies d'administration considérées.

En considérant que l'exposition humaine à la PLTX se fait très majoritairement par inhalation d'aérosols toxiques et par ingestion de produits de la mer contaminés, il convient de retenir ces deux voies d'exposition pour l'élaboration de VTR. Récemment, des données expérimentales chez l'animal sur la toxicité de la PLTX administrée par inhalation et par voie orale ont été publiées. L'exposition par voie cutanée et au niveau oculaire ne doit cependant pas être sous-estimée, notamment chez les aquariophiles amateurs et/ou professionnels qui peuvent être exposés de façon plus intense à la fois pour la voie inhalée et cutanée.

3.2.1. Toxicocinétique

Peu de données ont été publiées sur les paramètres cinétiques associés à une exposition à la PLTX. Compte tenu des atteintes systémiques observées dans des études de toxicité par inhalation et par gavage, il semble que la toxine puisse passer les barrières pulmonaires et intestinales et se distribuer dans différents organes. Cependant, il n'est pas possible de déterminer si ce passage des barrières pulmonaire et intestinale s'effectue avec ou sans altération de ces épithéliums. Quelle que soit la voie d'administration, aucune donnée n'est disponible pour le métabolisme et l'élimination de la PLTX.

3.2.2. Toxicité aiguë

- Données chez l'Homme

Il existe peu d'observations cliniques disponibles liées à une intoxication à la PLTX par la consommation de poissons ou de crustacés ; celles-ci sont principalement en lien avec la consommation d'espèces tropicales en Asie.

Pour les voies respiratoire et cutanée, les données disponibles sont principalement issues d'observations cliniques suite à une exposition liée à une activité de nettoyage d'aquariums contenant des coraux mous des genres *Zoanthus* et *Palythoa*, mais également lors d'activités sur la plage (CAPTV, 2022 ; Deeds *et al*., 2018 ; Hoffman *et al*., 2008 ; CCTV, 2018). Les symptômes présentés sont principalement des irritations oculaire, cutanée et respiratoire, et/ou des symptômes pseudo-grippaux (céphalées, myalgies, hyperthermie, tremblements, voire nausées et vomissements).

- Données chez l'animal

Des études sont disponibles par voie intraveineuse (IV) (Ito *et al*., 1982 ; Deeds et Schwartz, 2010 ; Kockskämper *et al*., 2004), intrapéritonéale (IP) (Ito *et al*., 1996 ; Rhodes *et al*., 2002 ; Riobó *et al*., 2008 ; Wiles *et al*.,1974 ; Poli *et al*., 2018), orale (Munday *et al*., 2008 ; Sosa *et al*., 2009 ; Boente-Juncal *et al*., 2020a), respiratoire (Wiles *et al*., 1974 ; Poli *et al*., 2018 ; Ito & Yasumoto, 2009) et cutanée (Wiles *et al*., 1974 ; Fujiki *et al*., 1986).

Les études par voie IV et IP sont décrites dans le rapport.

- **Voie orale**

Trois études récentes montrent que la DL_{50}[2] de la PLTX à 24 heures chez la souris par gavage est estimée respectivement à 510 µg/kg pc ($IC_{95\%}$ = 311-809 µg/kg pc), 599 µg/kg pc ($IC_{95\%}$ = 508-707 µg/kg pc) et 767 µg/kg pc ($IC_{95\%}$ = 549-1039 µg/kg pc) (Munday *et al*., 2008 ; Boente-Juncal *et al*., 2020a ; Sosa *et al*., 2009). Ces valeurs sont largement supérieures aux DL_{50} publiées pour les voies IV et IP. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la PLTX est une grosse molécule hydrophile dont l'absorption serait limitée au niveau du tractus gastro-intestinal et en partie dégradée par l'acidité de l'estomac. La toxicité (DL_{50}) de la PLTX pour les souris serait encore plus faible lors d'une exposition par ingestion volontaire (mélangée à de la nourriture) par comparaison avec une exposition par voie intra-péritonéale ou par gavage, puisqu'aucun effet n'a été observé à une dose de 2500 µg/kg pc (Munday, 2006). Il n'y a pas de relation entre la dose administrée et la durée de survie des individus exposés (Sosa *et al*., 2009).

[2] La DL_{50} (dose létale médiane) est la dose unique déduite statistiquement, censée provoquer la mort de 50 % des animaux auxquels la substance a été administrée.

Après un jeûne de 16 heures, Sosa *et al*. ont exposé, par gavage (10 mL/kg), des souris femelles CD-1 (n = 5/dose, 18-20 g, âgées de 4 semaines) à des doses uniques de PLTX[3] de 0, 300, 424, 600, 848, 1200 et 1697 µg/kg pc (dissoute dans du tampon phosphate (PBS)) avec un suivi pendant 24 heures (Sosa *et al*., 2009). Les symptômes les plus fréquents, observés chez les animaux n'ayant pas survécu pendant la période d'observation, sont : des spasmes (de localisation non spécifiée) (86%), une paralysie impliquant principalement les membres postérieurs (80%), une détresse respiratoire (70%), un grattage (57%), et des sauts (50%). Le grattage est observé de manière récurrente et à toutes les doses (hormis chez les non-exposés). Ces symptômes sont comparables à ceux observés après exposition par voie IP. Le caractère neurotoxique de la PLTX est attesté par ses effets indirects (sans que les mécanismes soient clairement élucidés) sur la fonction contractile des muscles squelettiques, ainsi que sur les muscles respiratoires. Des altérations histologiques sur différents organes (estomac, foie, pancréas, rein) ont également été observées, à la fois sur les souris mortes lors de la période de 24h d'observation et sur les souris ayant survécu. En particulier, l'analyse histologique des souris mortes montre quasi systématiquement des effets au niveau du foie et du pancréas, telle qu'une forte diminution, voire une absence, de glycogène hépatique. Au niveau pancréatique, une diminution des sécrétions enzymatiques des acini glandulaires a également été observée. D'après les symptômes, les muscles squelettiques et cardiaques sont ciblés par la toxine. Les auteurs proposent un NOAEL[4] de 300 µg/kg pc pour la PLTX après administration orale aiguë chez la souris (DL_{50} = 767 µg/kg pc ; $IC_{95\%}$ = 549-1039 µg/kg pc).

Ito et Yasumoto ont exposé des souris mâles ICR (âgées de 3-4 semaines, n = 4), sans jeûne alimentaire, à de la PLTX d'origine commerciale[5] administrée par gavage dans une solution saline de 200 µg/kg pc et ont suivi la mortalité sur 24 heures (Ito & Yasumoto, 2009). Un groupe témoin a été comparé aux groupes traités (n = 6). La PLTX a également été testée à 200 et 500 µg/kg pc (n = 4) avec un suivi de 2 heures. La dose de 200 µg/kg pc n'était pas létale. L'analyse *post mortem* des souris a révélé, à cette dose, des lésions légères de l'estomac, de l'intestin grêle, des poumons et des reins. Les auteurs notent également une légère accumulation de suc (ou sécrétions) gastrique dans l'estomac. Ces effets, qualifiés par les auteurs d'inflammatoires, sont apparus assez rapidement (en 2 heures). Les auteurs proposent, sur la base de ces observations, un LOAEL[6] de 200 µg/kg pc pour la PLTX, en contraste avec l'étude précédente.

Enfin, dans cette même étude, la PLTX a été administrée à des souris par voie sublinguale à une dose d'environ 200 µg/kg pc (176 à 235 µg/kg pc). Cette exposition est proposée pour mimer une intoxication alimentaire au cours de laquelle la toxine entre en contact avec les muqueuses buccales et de l'œsophage avant d'atteindre le reste du tractus digestif. La toxine a été déposée dans un volume très faible (2 µL) pour éviter qu'elle soit avalée. Les souris étaient « inactives » et présentaient une hyperventilation. L'examen *post mortem* des organes a révélé un léger saignement au niveau des poumons, apparu 30 minutes après l'exposition, suivi d'une inflammation interstitielle après 1,5-8 heures, puis de la destruction des alvéoles pulmonaires en 8-24 heures. Les tissus gastro-intestinaux apparaissaient jaunâtres, fragiles et œdématiés à 30 minutes. Les villosités de l'intestin grêle étaient lésées au niveau apical et présentaient une sécrétion de mucus. Au niveau des reins, les auteurs ont observé une

[3] isolée de *P. tuberculosa*, Wako, pureté >90%,
[4] No Observed Adverse Effect Level (= dose maximale n'entraînant pas d'effet néfaste observé)
[5] Wako, sans mention de la pureté
[6] Lowest Observed Adverse Effect Level (= dose minimale entraînant un effet néfaste observé)

atrophie glomérulaire après 8-24 heures. La PLTX, administrée au niveau de la cavité buccale, a atteint la circulation générale et les organes susmentionnés pour induire des perturbations structurales et fonctionnelles bien plus sévères qu'en administration *per os*. Cela suggère que la PLTX est partiellement dégradée lors de son passage dans le tractus digestif.

Dans l'étude de Boente-Juncal *et al*., des souris femelles Swiss (n = 3 à 9, 18-21 g, âgées de 4 semaines au début de l'expérience) ont été exposées, par gavage, sans jeûne alimentaire, à des doses de PLTX[7] de 0, 15, 36, 100, 350, 500, 750, 1200 µg/kg pc (en solution saline) (Boente-Juncal *et al*., 2020a). Les animaux ont été observés toutes les 2 heures jusqu'à la fin de la période d'observation (96 heures). L'étude de létalité a permis de déterminer une DL_{50} de 599,3 µg/kg pc ($IC_{95\%}$ = 508-707 µg/kg pc), proche des valeurs des deux études précédentes. À dose létale (1200 µg/kg pc), les souris mouraient dans les deux heures après administration par gavage de la toxine et présentaient des signes de détresse (ataxie, léthargie, cyphose, cyanose, dyspnée, pilo-érection) et des douleurs abdominales. Ces signes diminuaient, à mesure que les doses étaient réduites. À la dose de 750 µg/kg pc, une souris ayant survécu pendant 9 heures a présenté une hémorragie intense dans la cavité abdominale. Suite à ces observations, les auteurs proposent un NOAEL de 15 µg/kg pc, très éloigné de la valeur proposée par Sosa *et al*. en 2009 (300 µg/kg pc). Dans la présente étude, les souris exposées à 15 µg/kg pc de PLTX n'ont montré aucun signe de douleur, ni d'autres symptômes et sont restées en bonne santé, pendant la période d'observation totale (96 heures). Contrairement à l'étude de Sosa *et al*. (2009), les souris n'ont pas montré de grattage, ni de saut. L'une des différences entre les deux études est un accès libre à la nourriture et à l'eau pendant le traitement (Boente-Juncal *et al*., 2020a), alors que dans l'étude précédente, les animaux ont été privés de nourriture pendant 16 heures avant et 2 heures après le traitement (Sosa *et al*., 2009). Des analyses biochimiques sanguines ont également été réalisées sur des souris exposées à la toxine et comparées à des souris témoins. La PLTX n'a pas modifié la glycémie ou la cholestérolémie. Cependant, les concentrations plasmatiques d'alanine aminotransférase (ALAT), d'aspartate aminotransférase (ASAT), de la créatine phosphokinase (CPK) et de la lactate deshydrogénase (LDH) ont augmenté de manière significative, après une administration de PLTX à des doses de 36 µg/kg pc et plus. Les faibles doses de PLTX ne provoquaient pas de changements significatifs de la natrémie et de la chlorémie ; seule une augmentation significative a été observée à la dose de 300 µg/kg pc (pour Na^+ et Cl^-) alors qu'à 1200 µg/kg pc, seule une diminution de la natrémie était observée. Enfin, une augmentation de la kaliémie a été observée aux fortes doses (750 et 1200 µg/kg pc). L'analyse ultra-structurale du foie et des reins a été réalisée sur des souris témoins et traitées avec 500 et 750 µg/kg pc de PLTX. Des lésions hépatiques étaient visibles après 96 heures. Les effets de la PLTX se manifestaient également au niveau des reins. A 750 µg/kg pc (mais pas à 500 µg/kg pc), la PLTX a provoqué des altérations de la structure du néphron : les noyaux des podocytes étaient irréguliers et les podocytes individuels fusionnés. Boente-Juncal *et al*., soulignent que ces effets sur les reins peuvent être reliés aux effets observables chez l'Homme après intoxication par la PLTX (Wu *et al*., 2014).

Récemment, Sosa *et al*. ont exposé par gavage des souris CD-1 femelles (n = 8), sans jeûne alimentaire, à des doses uniques de PLTX[8] de 0, 30, 90 et 270 µg/kg pc et ont réalisé un suivi pendant 24 heures (Sosa *et al*., 2022). La mortalité observée était de 0/16 pour les animaux témoins, de 0/8 à 30 µg/kg pc, de 2/8 à 90 µg/kg pc et de 2/8 à 270 µg/kg pc. Après 24 heures de suivi, aucun signe de toxicité n'a été observé à la dose de 30 µg/kg pc. A la dose de 90 µg/kg pc, les observations cliniques étaient des comportements de grattage (1/8), une

[7] extraite de *P. tuberculosa*, Wako, pure à 88,9%
[8] Wako chemical GmbH, pureté >90%

piloérection (2/8), des spasmes musculaires (2/8) et une dilatation abdominale (1/8). A la dose de 270 µg/kg pc, les auteurs ont observé des comportements de grattage (1/8), une piloérection (2/8), une sédation (2/8), des tremblements (2/8), une agitation (2/8), une paralysie (3/8), une dyspnée (2/8), des spasmes musculaires (2/8), une dilatation abdominale (1/8).

- **Voie respiratoire (inhalée, intratrachéale, instillation intranasale)**

Chez des rats mâles Wistar (n = 21) exposés à la PLTX (solution aqueuse avec 50% d'éthanol) par voie intratrachéale, les DL_{50} à 24 heures, 5 et 10 jours ont été estimées respectivement à 0,36 µg/kg pc ($IC_{95\%}$ = 0,23-0,55 µg/kg pc), 0,31 µg/kg pc ($IC_{95\%}$ = 0,17-0,54 µg/kg pc) et 0,18 µg/kg pc ($IC_{95\%}$ = 0,09-0,38 µg/kg pc). Les signes de toxicité rapportés sont similaires à ceux observés avec une injection IV mais avec des difficultés respiratoires plus importantes et une respiration sifflante (Wiles *et al*., 1974).

Dans l'étude de Poli *et al*., des rats Fischer femelles (n = 15) ont été exposés par inhalation à la PLTX (Poli *et al*., 2018). La DL_{50} de la PLTX est de 0,041 µg/kg pc. Des lésions histologiques ont été observées sur un grand nombre de tissus 12 heures après l'exposition, incluant les tissus :

- pulmonaire chez tous les rats (lésions modérées à sévères),
- nasal (dégénérescence de l'épithélium, nécrose légère à modérée avec inflammation à neutrophiles),
- de la trachée (nécrose, dégénérescence et/ou perte de l'épithélium),
- hépatique (congestion marquée de la zone centro-lobulaire sans changement significatif au niveau des hépatocytes),
- lymphoïde (thymus, rate, ganglions lymphatiques mésentériques et/ou mandibulaires) (nécrose et/ou apoptose légère à modérée des lymphocytes et/ou déplétion),
- cardiaque (dégénérescence légère des cardiomyocytes du ventricule droit et/ou du muscle papillaire droit, nécrose aiguë avec augmentation de l'éosinophilie du cytoplasme et pycnose nucléaire avec ou sans précipitation minérale),
- rénal (dégénérescence/nécrose de l'épithélium rénal tubulaire chez quelques rats),
- de la glande salivaire (dégénérescence/nécrose de l'épithélium du conduit de la glande salivaire mandibulaire chez quelques rats).

Vingt-quatre et 36 heures après exposition, tous les rats présentaient des lésions similaires à celles observées à 12 heures au niveau de l'ensemble de ces tissus et organes avec un degré de sévérité croissant avec le temps.

L'instillation intratrachéale de PLTX chez la souris a provoqué une hémorragie alvéolaire, un œdème pulmonaire, une érosion gastro-intestinale et une atrophie glomérulaire (Ito & Yasumoto, 2009). La mort survenait à la suite de symptômes paralytiques, pour une dose de 2 µg/kg pc chez la souris et de 5 à 7,5 µg/kg pc chez le rat (temps d'observation non indiqué). À une dose sublétale (1 µg/kg pc), les rongeurs étaient paralysés et ne pouvaient plus se mouvoir pendant 1 à 2 heures, avant de se rétablir. Après 24 heures, les animaux présentaient un comportement normal, mais l'analyse histologique a révélé de multiples lésions tissulaires (poumons, tractus gastro-intestinal et reins).

Après euthanasie, des lésions au niveau des poumons et du foie ont été observées, chez des rats (femelles) exposées par instillation intranasale à une dose d'aérosol de 0,05 µg/kg pc de PLTX (Poli *et al*., 2018). Des effets pulmonaires (congestion pulmonaire, consolidations des lobes et/ou zones d'hémorragie) et hépatiques (lésions hépatocytaires, zones d'hémorragie, congestion) ont été observés. Certains rats présentaient une épistaxis (hémorragie nasale) et/ou des croûtes rouges autour des paupières et des narines (Poli *et al*., 2018).

- **Voie cutanée**

Lors d'une injection intradermique de 1 et 10 µg/mL PLTX (soit 0,11 et 0,55 µg de toxine) chez plusieurs espèces (rats, cobayes et lapins), un blanchiment de la peau est apparu au point d'injection dans les 15 à 30 minutes, indiquant une vasoconstriction aiguë des capillaires sanguins. Après 1 à 2 heures, un œdème et un érythème ont été observés autour de la zone initiale blanchie. Les auteurs n'ont relevé aucun signe de toxicité, ou de létalité, dus à des effets systémiques de la PLTX. Les examens macroscopique et microscopique *post mortem* des animaux ont révélé une nécrose focale au site d'injection avec une inflammation locale. Ils ont aussi constaté une nécrose rénale et des altérations des vaisseaux pulmonaires. Ces données suggèrent qu'une partie de la PLTX est distribuée de manière systémique et a affecté des organes internes (poumons, reins), ce qui corrobore les études d'exposition par voie orale à la PLTX.

Pour la voie percutanée, l'application de 0,05 ou 0,1 mL de PLTX (5 µg/mL) sur la peau d'un lapin a induit, au bout de 1 à 2 h, l'apparition d'une zone blanchie et légèrement œdématiée au site d'application (Wiles *et al*., 1974). Après 4 à 5 heures, les auteurs ont constaté un œdème et une nécrose de la zone blanchie et de la zone enflammée périphérique. Bien que l'étude ne soit réalisée que sur un seul animal, ce résultat suggère que la PLTX agit en induisant des effets nécrosants et inflammatoires au niveau de la peau. Une étude plus récente a testé différentes doses de PLTX extraite de *P. tuberculosa* sans mention de pureté. Les quantités de PLTX utilisées étaient de 0,3 ; 3,3 ; 8,25 ; 33 et 165 µg, en application topique, sur des oreilles de souris (Fujiki *et al*., 1986). L'effet irritant de la PLTX, mesurée comme étant la quantité de toxine induisant un érythème des oreilles de 50 % des souris testées 24 heures après l'application, était de 0,02 µg/oreille. Les souris mouraient en 4 heures, après l'application sur l'oreille de 33 ou 165 µg de PLTX.

3.2.3. Irritations cutanée et oculaire

Chez l'Homme, des symptômes dermatologiques, notamment des dermatites, ont été associés à l'exposition cutanée à la PLTX pendant des proliférations d'*Ostreopsis* (Pelin *et al*., 2011), ce qui nécessiterait de disposer de données expérimentales *in vivo* pour pouvoir caractériser les effets de la PLTX sur la peau.

Chez l'animal, des effets oculaires ont été détectés après l'instillation conjonctivale chez des lapins de PLTX à 0,1 ; 0,2 et 0,4 µg/kg pc sans rinçage (Wiles *et al.,* 1974), incluant larmoiement modéré, irritation, œdème et conjonctivite au bout de 4 heures d'exposition. À 24 heures, les yeux affectés étaient complètement fermés, avec un exsudat de pus et de sang, ainsi qu'une conjonctivite sévère avec œdème, ulcération et opacité cornéennes. Les plus fortes concentrations de PLTX ont provoqué des séquelles irréversibles. Avec les doses plus faibles, la récupération était rapide et complète.

3.2.4. Sensibilisation

Aucune étude n'a été identifiée dans la littérature chez l'Homme et l'animal.

3.2.5. Toxicité répétée et chronique

- **Données chez l'Homme**

L'exposition humaine de manière répétée à la PLTX est susceptible de se produire par la consommation de produits de la mer contaminés, notamment pour des populations vivant dans des zones littorales. Une exposition répétée pendant une période limitée est alors probable. Quelques études expérimentales se sont intéressées à la toxicité de la PLTX par voie orale

après des administrations répétées. Néanmoins, aucune étude de toxicité répétée ou chronique de la PLTX pour les voies orale, inhalée (inhalation ou instillation intratrachéale) et cutanée n'est disponible chez l'Homme.

- **Données chez l'animal**

Chez l'animal, seules des études par voie orale (Del Favero *et al*., 2013 ; Boente-Juncal *et al*., 2020b), cutanée (Fujiki *et al.,* 1986) et IP (Ito *et al.,* 1997 – décrite dans le rapport) sont disponibles.

- **Voie orale**

Dans l'étude de Del Favero *et al*., la PLTX extraite de *P. tuberculosa* (Wako, pure à plus de 90% dissoute dans du PBS) a été administrée par gavage à des doses de 0, 30, 90 et 180 µg/kg pc/j, pendant 7 jours consécutifs, à des groupes de 6 souris femelles CD1 suivis d'une phase de récupération (sans intervention) de 2 semaines (Del Favero *et al*., 2013). Au cours du traitement, des mortalités respectives de 33, 33 et 83% ont été rapportées aux doses de 30, 90 et 180 µg/kg/j. Au cours de la phase de récupération, une souris du groupe avec la plus faible dose et deux du groupe avec la dose intermédiaire sont mortes. Par ailleurs, le poids des souris a diminué jusqu'à 40% dans tous les groupes traités. Cette perte de poids était associée à la diminution de la consommation de nourriture dès le deuxième jour. Juste avant la mort, les souris montraient les symptômes suivants : une perte de coordination motrice, une hypo-réactivité, une sédation générale avec une perte de réflexes. Chez certains animaux, une paralysie des membres inférieurs a été observée. La mort était précédée de difficultés respiratoires et de halètements. Indépendamment des effets létaux, l'abdomen était dilaté, dès le 3ème jour de traitement affectant plus de souris à la plus faible dose (4/6) qu'à la dose intermédiaire (3/6) et la dose forte (1/6). À la différence du foie, des poumons et du cerveau, une augmentation du poids relatif des reins, de la rate et du cœur a été observée uniquement à la plus forte dose (180 µg/kg pc/j). Au niveau pulmonaire, des altérations histologiques (œdème alvéolaire faible à sévère associé parfois à une inflammation aiguë et à de la nécrose) ont été observées chez 2 des 6 souris mortes prématurément et ce, quelle que soit la dose. Des altérations du muscle cardiaque (séparation des fibres musculaires) pour les doses de 90 et 180 µg/kg pc/j et, dans une moindre mesure à 30 µg/kg pc/j ont également été rapportées.

Dans la seconde expérience, réalisée pour déterminer un NOAEL, des groupes de 8 souris ont été exposés à 0, 3 ou 30 µg/kg pc/j pendant 7 jours consécutifs (Del Favero *et al*., 2013). Comme précédemment, 4 souris par groupe étaient euthanasiées 24 heures après le dernier gavage. Les animaux restants ont été suivis pendant 2 autres semaines pour évaluer la réversibilité des symptômes. Aucune mortalité n'a été observée au cours de cette seconde expérience. Aucune anomalie ou signe clinique n'a été observé dans le groupe traité à 3 µg/kg pc/j alors que les souris traitées à 30 µg/kg pc/j montraient des faibles signes d'hypoactivité transitoires et des épisodes de grattage sporadiques. De plus, deux souris présentaient une dilatation de l'abdomen. Aucun changement de poids n'a été observé à 3 µg/kg pc/j, alors qu'une diminution de 25% associée à une diminution de la consommation de nourriture a été rapportée à 30 µg/kg pc/j. Pendant la période de récupération, le poids et la consommation de nourriture sont revenus à la normale. Aucun effet sur les poids relatifs des différents organes (foie, reins, poumons, rate, cerveau et cœur) n'a été observé.

Cette étude montre que l'administration orale quotidienne de PLTX pendant 7 jours peut être létale à partir de 30 µg/kg pc/j, dose 17 fois inférieure à la DL_{50} après administration unique.

Le fait que la mortalité puisse être observée plusieurs jours après l'exposition indique que les effets toxiques induits par la répétition de l'exposition ne sont pas entièrement réversibles et peuvent s'avérer fatals. Les auteurs proposent un NOAEL de 3 µg/kg pc/j et un LOAEL de 30 µg/kg pc/j. A ce LOAEL, les poumons, le cœur, le foie et le tractus gastro-intestinal sont des cibles importantes de la PLTX.

Dans l'étude de Boente-Juncal *et al*., la toxicité répétée de la PLTX extraite de *P. tuberculosa*[9] a été évaluée chez des souris femelles Swiss (n = 3-10/groupe) exposées par gavage pendant une période de 28 jours à des doses de 0,03 ; 0,1 ; 0,3 ; 1, 3,5 ; et 10 µg/kg pc/j (Boente-Juncal *et al*., 2020b). Une DL_{50} de 0,44 µg/kg pc a été calculée. À 10 µg/kg pc/j, aucune souris n'a survécu après 18 jours de traitement alors qu'à 3,5 et 0,3 µg/kg pc/j, respectivement 75% et 43% de mortalité étaient constatés. Les premiers décès ne sont survenus que tardivement (à partir de 17 jours de traitement) pour la dose 0,3 µg/kg pc/j. À 0,03 µg/kg pc/j, aucune mortalité n'a été observée. Les temps de survie différaient considérablement d'un animal à un autre et pour chaque dose de toxine.

A la dose de 0,03 µg/kg pc/j, aucun symptôme évocateur d'une intoxication à la PLTX n'a été observé. A la dose de 0,1 µg/kg pc/j, des symptômes typiques (léthargie, piloérection, douleurs abdominales, œdème de la face, cyphose) ont été observés. Les souris exposées à 1 et 3,5 µg/kg pc/j ont subi une perte de poids. L'apparition des symptômes était dose-dépendante. Certains symptômes n'apparaissaient qu'à des doses plus élevées comme l'ataxie, la dyspnée et les mouvements circulaires (à partir de 1 µg/kg pc/j) ou bien des vocalisations (à partir de 3,5 µg/kg pc/j).

Aucune altération macroscopique n'a été relevée à la dose de 0,03 µg/kg pc/j. En revanche, une dilatation de l'abdomen et la présence de gaz et de mucus au niveau de l'estomac et des intestins étaient fréquemment observées chez certains animaux traités aux doses supérieures. Au dernier jour de traitement, la quantité cumulée d'urine était moindre pour les souris traitées aux doses de 1 et 3,5 µg/kg pc/j. Aucun effet sur la masse cumulée de fèces n'a été observé.

L'exposition répétée a entraîné des effets significatifs sur les paramètres biochimiques sanguins et urinaires après 28 jours ou juste après la mort de l'animal. Les quatre enzymes (ALAT, ASAT, CK, LDH) avaient des niveaux augmentés à 0,1 et 0,3 µg/kg pc/j. Une augmentation des ASAT et ALAT a également été observée à 1 et 3,5 µg/kg pc/j. Des variations significatives de la natrémie (diminution à la dose de 0,3 µg/kg pc/j) et de la kaliémie (augmentation aux doses de 0,03, 0,1 et 0,3 µg/kg pc/j, que les experts du CES ont estimé rester dans les normales physiologiques pour cette espèce) et consécutivement du rapport Na+ /K+ ont été observées. La chlorémie était également augmentée pour les doses de 0,03 à 1 µg/kg pc/j).

De plus, des altérations macroscopiques au niveau du tractus digestif et des altérations ultrastructurales de l'estomac ont été observées dès la dose de 0,1 µg/kg/j. Pendant la période d'exposition de 28 jours, les souris ayant reçu une dose quotidienne de 0,03 µg/kg pc/j de PLTX n'ont pas présenté de modification notable. Les auteurs proposent un NOAEL de 0,03 µg/kg pc/j.

- **Voie cutanée**

Aucune étude *in vivo* sur les mammifères ou chez l'Homme n'est disponible quant à d'éventuels effets toxiques de la PLTX par voie cutanée.

[9] Wako, pure à 88,9%

3.2.6. Effets sur la reproduction et le développement

Aucune étude *in vivo* sur les mammifères ou chez l'Homme n'est disponible quant aux effets de la PLTX sur la reproduction ou le développement.

3.2.7. Génotoxicité

La PLTX s'est révélée négative dans le test de mutagénèse d'Ames sur des souches de *Salmonella typhimurium* avec ou sans activation métabolique. De plus, elle n'agit pas comme initiateur dans le test de transformation *in vitro* des cellules BALB/c 3T3, ou sur la peau de souris *in vivo* (Fujiki et al., 1986 ; Munday, 2011).

3.2.8. Cancérogénicité

Aucune étude chez l'Homme n'est disponible sur la cancérogénicité de la PLTX.

Chez l'animal, à la suite de l'administration répétée sur la peau de souris (0,5 µg, 2 fois par semaine pendant 30 semaines), la PLTX n'a induit aucune tumeur mais des effets toxiques systémiques : 8 souris seulement sur 15 ont survécu à la semaine 30. En revanche, si le même schéma d'application était réalisé après une étape d'initiation avec 100 µg de diméthylbenzoanthracène (DMBA), 62,5% des souris présentaient des tumeurs (avec une moyenne d'1 tumeur par souris) : sept papillomes et un carcinome épithélioïde précoce invasif. La dose totale de PLTX nécessaire pour une incidence de 50% de tumeurs a été estimée à 15 µg (Fujiki *et al.,* 1986). Cet article souligne l'effet promoteur tumoral de la PLTX au niveau cutané.

3.2.9. Mécanisme d'action

La PLTX inhibe le fonctionnement normal de la pompe Na/K-ATPase en la transformant temporairement en un canal ionique permettant ainsi le passage transmembranaire d'ions selon leur gradient de concentration (Takeuchi *et al*., 2009). Les cations monovalents (Na^+, K^+) peuvent ainsi passer à travers le canal ionique généré par la PLTX (Habermann, 1989 ; Scheiner-Bobis *et al*., 2002).

La pompe Na/K-ATPase est un hétéro-complexe protéique composé de deux sous-unités α et β, et d'une sous-unité γ régulatrice. Chaque sous-unité α et β présente différentes isoformes dont le profil d'expression diffère selon les tissus, voire selon le sexe et l'âge. La variabilité interindividuelle de réponse aux intoxications par inhalation avec la PLTX pourrait s'expliquer par l'existence de variants génétiques de la Na/K-ATPase (Pelin *et al*., 2020).

Pelin *et al*. ont montré sur des cellules HaCaT (kératinocytes) que la cytotoxicité de la PLTX n'est pas contrecarrée en présence d'inhibiteurs du stress oxydant[10] indiquant que le stress oxydant n'est pas le mécanisme principal de cette toxicité (Pelin *et al*., 2013). Ainsi, la toxicité de la PLTX est due à l'altération de l'homéostasie ionique normale dans les cellules excitables et non excitables (Wu, 2009 ; Rossini & Bigiani, 2011).

L'interaction de la PLTX avec la Na/K-ATPase induit donc une modification de la perméabilité ionique membranaire dans un premier temps, conduisant à une dépolarisation et un influx de Ca^{2+} dans un second temps (Amano *et al*., 1997 ; Schilling *et al*., 2006) puis la lyse cellulaire et ce, pour différents types de cellules (Satoh *et al*., 2003 ; Schilling *et al.,* 2006 ; Munday,

[10] inhibiteur non sélectif de NADPH oxydase (NOX), le chlorure de diphénylèneiodonium et l'acétate de méthyl-L-arginine (inhibiteur de l'oxyde nitrique synthase (NOS)

2011). De nombreux effets cellulaires de la PLTX sont liés à cette augmentation de Ca^{2+} intracellulaire.

Alors qu'aucun effet de la PLTX sur la H/K-ATPase humaine non gastrique n'a été rapporté, (Guennoun *et al.,* 2007), d'autres auteurs montrent que la PLTX peut cibler la H/K-ATPase au niveau du colon, la convertissant apparemment en canal (Scheiner-Bobis *et al.,* 2002).

3.2.10. Populations sensibles

Les informations disponibles sur les expositions humaines à la PLTX (CAPTV Bordeaux, 2022) montrent qu'il n'existe pas de variations importantes des symptômes en fonction des classes d'âge ou du sexe des personnes exposées. Les symptômes observés sont majoritairement de la toux, des douleurs oropharyngées et une rhinite aiguë, quel que soit l'âge des personnes. À noter cependant une forte présomption d'association statistique entre le niveau de gravité des symptômes et l'existence d'au moins un antécédent médical (rhinites allergiques, asthme, allergies, tabagisme) par rapport aux personnes ne présentant pas d'antécédent médical.

L'ensemble de ces éléments suggère que les populations atteintes de pathologies respiratoires (asthme, rhinites allergiques), d'allergie ou d'antécédent tabagique peuvent présenter une sensibilité exacerbée à l'exposition à la PLTX par inhalation.

3.3. Recueil des VTR

Seule l'EFSA a proposé en 2009 une ARfD (acute reference dose) par ingestion de 0,2 µg/kg pc pour la PLTX et une autre toxine apparentée (l'ostréocine D) en se fondant sur l'étude de Ito et Yasumoto de 2009 qui permet d'identifier un LOAEL de 200 µg/kg pc chez la souris pour la PLTX avec en support l'étude de Sosa *et al.* de 2009 qui montre une absence d'effet (NOAEL) à 300 µg/kg pc chez la souris pour la PLTX.

Tableau 1 : ARfD de l'EFSA (EFSA, 2009)

Organisme (année)	Effet critique Étude clé	PoD (Point de départ)	Facteurs d'incertitude	VTR
EFSA (2009)	Accumulation de fluides gastriques et atteintes multiviscérales (estomac, intestins, poumons et reins) Ito et Yasumoto (2009)	LOAEL = 200 µg/kg pc	1000 FI_L=10 FI_A = 10 FI_H = 10	ARfD = 0,2 µg/kg pc

Aucune VTR moyen et long terme pour la voie orale et aucune VTR court, moyen et long terme pour les voies inhalée et cutanée n'a été identifiée pour la PLTX.

3.4. Proposition de VTR court terme par voie orale

3.4.1. Choix de l'effet critique

Les symptômes observés suite à une exposition à la PLTX par voie orale chez la souris sont une léthargie, une ataxie, des douleurs abdominales, une dyspnée, une piloérection. Ces

symptômes sont cohérents avec les données cliniques issues d'intoxications en lien avec une prolifération d'*Ostreopsis*. **Le CES retient comme effet critique l'ensemble de ces symptômes qui apparaissent suite à une exposition aiguë à la PLTX.**

3.4.2. Analyse des VTR court terme existantes

L'EFSA a proposé en 2009 une ARfD de 0,2 µg/kg pc pour la PLTX et une autre toxine du même groupe (**Tableau 1**). **Le CES n'a pas retenu la VTR de l'EFSA** considérant que l'étude de Ito et Yasumoto de 2009 présente de nombreux biais méthodologiques (faible nombre d'animaux, une seule dose testée, score ToxRtool de 3), et que d'autres études montrent des effets à des doses plus faibles. **Ainsi, le CES propose de construire une VTR court terme.**

3.4.3. Choix de l'étude clé

L'analyse critique et le score ToxRtool[11] des 5 études court terme disponibles sont indiqués dans le tableau 2.

Tableau 2 : Analyse critique des études court terme par voie orale

Références	Score ToxRtool	Analyse critique
Wiles *et al.,* 1974	3	Nombreuses limites méthodologiques incluant l'absence d'un groupe d'animaux témoins, une solution de PLTX diluée à 50% d'éthanol.
Sosa *et al.,* 2009	1	Étude jugée de bonne qualité. Elle permet d'identifier un NOAEL à 300 µg/kg/j et un LOAEL à 424 µg/kg/j. Limites : - le suivi des symptômes n'est réalisé que sur 24 heures alors que les effets de la PLTX peuvent être retardés dans le temps, - les doses testées sont relativement élevées (la dose testée la plus faible était de 300 µg/kg).
Ito et Yasumoto, 2009	3	Limites méthodologiques : faible effectif d'animaux, pureté de la PLTX non spécifiée.
Boente-Juncal *et al*., 2020a	1	Étude jugée de bonne qualité. Elle permet d'identifier un NOAEL de 15 µg/kg pc sur la base des observations cliniques réalisées sur un temps de suivi long (96 heures) et bien documentées chez la souris (dyspnée et douleurs abdominales) à la dose de 36 µg/kg pc.
Sosa *et al.,* 2022	1	Étude jugée de bonne qualité. Elle permet d'identifier un NOEL de 30 µg/kg pc sur la base des effets observés à la dose de 90 µg/ kg pc (grattage, sédation, spasmes musculaires). Limite : le suivi des symptômes n'est réalisé que sur 24 heures alors que les effets de la PLTX peuvent être retardés dans le temps.

Parmi ces études, trois études présentent une qualité méthodologique équivalente avec un score ToxRtool de 1 : les études de 2009 et 2022 de Sosa et *al*. et l'étude 2020a de Boente-

11 ToxRTool est un outil d'évaluation de la fiabilité des données toxicologiques, rendant ainsi le processus de décision d'attribution des catégories de fiabilité plus transparent et harmonisé. Scores : 1 = fiable sans restrictions, 2 = fiable avec restrictions, 3 = non fiable, 4 = non catégorisable.

Juncal *et al*. . L'équipe de Sosa *et al*. a administré une dose unique de PLTX à des animaux par voie orale avec un suivi sur 24 heures après l'exposition (Sosa *et al*., 2009 et 2022), alors que l'équipe de Boente-Juncal *et al*. a administré une dose unique de PLTX à des animaux par voie orale mais avec un suivi plus long de 96 heures. Les données cliniques humaines ont montré que les effets pouvaient être retardés dans le temps suite à une exposition à la PLTX (CAPTV Bordeaux, 2022). Dans l'étude de Sosa *et al*. de 2009, le rapport entre la DL_{50} et le NOEL est de 2,56 alors que ce rapport est de 40 dans l'étude de Boente-Juncal *et al*., ce qui souligne une meilleure estimation de la NOAEL dans cette dernière étude. Sur la base de ces éléments, **le CES retient l'étude de Boente-Juncal *et al*. (Boente-Juncal *et al*., 2020a) comme étude clé**.

Les études disponibles dans la littérature ont des approches méthodologiques davantage axées sur la détermination de DL_{50} que sur le NOAEL ou le LOAEL. Les experts regrettent que les effets investigués dans ces études ne soient que la léthargie, les douleurs abdominales, les dyspnées, l'ataxie, et qu'elles ne couvrent pas des effets pouvant apparaître à des doses plus faibles et potentiellement plus graves comme la cardiotoxicité.

3.4.1. Choix du point de départ

Selon la méthode d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses, 2017), la construction d'une Benchmark Dose (BMD) est à privilégier. Si les données disponibles ne le permettent pas, un NOAEL est retenu comme PoD en second choix et un LOAEL en dernière option. L'approche par BMD a été réalisée mais n'a pas été retenue compte tenu du manque de robustesse des données (faible effectif) et de l'intervalle de confiance important autour de la BMD.

Ainsi, le CES retient le NOAEL décrit dans l'étude 2020a de Boente-Juncal *et al*. de 15 µg/kg pc chez la souris comme PoD.

NOAEL = 15 µg/kg pc

3.5. Ajustement allométrique

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

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

Le poids moyen des souris retenu est de 22 g, fondé sur l'intervalle des poids de souris renseigné dans l'étude (18 – 22g). Celui utilisé pour l'Homme pour le calcul est de 70 kg.

Le PoD ajusté est : **$NOAEL_{HED}$ = 2 µg/kg pc**

3.5.1. Choix des facteurs d'incertitude

Le calcul de la VTR à partir de l'étude 2020a de Boente-Juncal *et al.* a été effectué à l'aide des facteurs d'incertitude suivants (Anses, 2017) :

- Variabilité inter-espèces (FI_A) : $FI_{A\text{-}TD}$ = 2,5. L'ajustement allométrique réalisé a permis de calculer une dose équivalente humaine. Pour tenir compte de la variabilité

toxicodynamique et d'incertitudes résiduelles, un facteur d'incertitude supplémentaire a été fixé à 2,5 selon les recommandations de l'OMS-IPCS (OMS-IPCS, 2005) et sur la base des pratiques de l'Anses (Anses, 2017).

- Variabilité interindividuelle (FI_H) : 10. Aucune donnée scientifique permettant de réduire la valeur par défaut n'étant disponible, la valeur de 10 est utilisée.
- Utilisation d'un point de départ ($FI_{B/L}$) : 1
- Insuffisance des données (FI_D) : 1

Un facteur d'incertitude global de 25 est donc utilisé pour la construction de la VTR.

3.5.2. Proposition de VTR court terme par voie orale et niveau de confiance

VTR = 0,08 µg/kg pc/j

S'agissant d'une VTR pour une exposition unique par voie orale, la valeur est à considérer comme une VTR aiguë.

Un **niveau de confiance global moyen-faible** a été attribué à cette VTR en se fondant sur les critères suivants : la nature et la qualité dans le corpus de données (niveau confiance moyen), choix de l'effet critique et le mode d'action (niveau de confiance moyen), choix de l'étude clé (niveau de confiance faible) et choix du PoD (niveau de confiance faible).

Les études disponibles dans la littérature ont des approches méthodologiques davantage axées sur la détermination de DL_{50} que sur le NOAEL ou le LOAEL. Les experts regrettent que les effets investigués dans ces études ne soient que la léthargie, les douleurs abdominales, les dyspnées, l'ataxie, et qu'elles ne couvrent pas des effets à des doses plus faibles et potentiellement plus graves comme la cardiotoxicité.

3.6. Proposition de VTR court terme par voie inhalée

Deux études de toxicité aiguë par voie respiratoire sont disponibles : Wiles *et al.* de 1974 par voie intratrachéale et Poli *et al*. de 2018 par voie inhalée. L'étude de Wiles *et al*. de 1974 étant de qualité limitée sur le plan méthodologique (voie d'exposition inadéquate : intratrachéale et solution de PLTX diluée à 50% dans de l'éthanol), le CES ne retient pas cette étude comme étude clé. Bien que l'étude de Poli *et al.* de 2018 soit la seule disponible pour cette voie, le CES considère qu'elle ne peut pas être retenue comme étude clé du fait de nombreuses limites méthodologiques (absence de témoins, schéma d'exposition peu clair et source de confusion dans l'interprétation, étude de l'effet du temps sur une seule dose) et de l'incohérence du rapport entre la toxicité de la voie inhalée et de la voie intrapéritonéale qui ne correspond pas aux autres études.

Ainsi, considérant l'absence de données humaines et la qualité insuffisante des données animales, aucune VTR pour une exposition court terme n'a pu être proposée pour la voie inhalée. De plus, considérant le manque de données de toxicocinétique et la grande disparité des résultats de DL_{50} observés chez l'animal pour les différentes voies d'exposition, le CES n'a pas jugé pertinent de réaliser une extrapolation voie à voie.

Le CES souligne l'absence de données pour ce mode d'exposition qui correspond à une voie d'exposition majeure pour l'Homme.

3.7. Proposition de VTR court terme par voie cutanée

Du fait des caractéristiques physico-chimiques de la PLTX (poids moléculaire élevé et hydrosolubilité), la voie cutanée par exposition locale n'est pas attendue comme point de passage systémique pour la PLTX. Considérant ces éléments et les limites (administration topique et intradermique, dose unique) des études décrites pour cette voie (Wiles *et al*., 1974 ; Fujiki *et al*., 1986), le CES ne retient pas ces études comme études clés. **Ainsi, aucune VTR pour une exposition court terme n'a pu être proposée pour la voie cutanée. De plus, considérant le manque de données de toxicocinétique et la grande disparité des résultats de DL_{50} observés chez l'animal pour les différentes voies d'exposition, le CES n'a pas jugé pertinent de réaliser une extrapolation voie à voie.**

3.8. Proposition de VR moyen terme par voie orale

3.8.1. Choix de l'effet critique

Les symptômes observés suite à une exposition orale répétée pendant 28 jours à la PLTX chez la souris sont une léthargie, une ataxie, des douleurs abdominales, une dyspnée et de la piloérection. Ces effets sont cohérents avec l'ensemble des observations réalisées chez l'animal quelle que soit la durée de l'exposition.

Le CES retient comme effet critique l'ensemble des symptômes observés pour une exposition répétée à la PLTX.

3.8.2.Analyse des VTR moyen terme existantes

En l'absence de VTR moyen terme, **le CES propose de construire une telle VR**.

3.8.3. Choix de l'étude clé

La seule étude de toxicité répétée présentant une durée d'exposition compatible avec la dérivation d'une valeur moyen terme est l'étude 2020b de Boente-Juncal *et al*.. Celle-ci a été jugée de bonne qualité (score ToxRtool 1) bien que réalisée sur un faible nombre d'animaux (l'effectif est variable en fonction de la dose). Les données montrent que, pendant la période d'exposition de 28 jours, les souris ayant reçu une dose quotidienne de 0,03 µg/kg pc/j de PLTX n'ont pas présenté d'effets néfastes notables. Le seul effet statistiquement significatif est une hyperkaliémie (2 souris sur 5) que les experts ont estimé être dans les valeurs usuelles physiologiques pour cette espèce. Cette étude permet donc d'identifier un NOAEL de 0,03 µg/kg et un LOAEL de 0,1 µg/kg sur la base de l'ensemble des effets observés à cette dose. Ces résultats permettent aux auteurs de proposer un NOAEL de 0,03 µg/kg pc. Ainsi, **le CES retient l'étude de Boente-Juncal *et al*. comme étude clé (Boente-Juncal *et al*., 2020b).** Néanmoins, les experts regrettent que les effets investigués dans cette étude ne soient que la léthargie, les douleurs abdominales, les dyspnées, l'ataxie et qu'ils ne couvrent pas des effets à des doses plus faibles et potentiellement plus graves comme la cardiotoxicité.

3.8.4. Choix du point de départ

Les préconisations de méthodologie suggèrent de privilégier la construction d'une Benchmark Dose (BMD) chaque fois que les données disponibles le permettent, de retenir un NOAEL en second choix et un LOAEL en dernière option (Anses, 2017).

Les données de cette étude de Boente-Juncal *et al*. et la relation dose-réponse des effets observés n'ont pas permis de construire de BMD.

Le CES retient donc le NOAEL comme point de départ, soit un **NOAEL de 0,03 µg/kg pc/j**.

3.8.5. Ajustement allométrique

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

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

Le poids moyen des souris disponible dans l'étude est de 27 g. Celui utilisé pour l'Homme pour le calcul est de 70 kg.

$NOAEL_{HED}$ = 0,004 µg/kg pc/j

3.8.6. Choix des facteurs d'incertitude

Le calcul de la VTR à partir de l'étude 2020b de Boente-Juncal *et al.* a été effectué à l'aide des facteurs d'incertitude suivants (Anses, 2017) :

- Variabilité inter-espèces (FI_A) : 2,5

L'ajustement dosimétrique réalisé a permis de calculer une dose équivalente humaine. Pour tenir compte de la variabilité toxicodynamique et d'incertitudes résiduelles, un facteur d'incertitude supplémentaire a été fixé à 2,5 selon les recommandations de l'OMS-IPCS (OMS-IPCS, 2005) et sur la base des pratiques de l'Anses (Anses, 2017).

- Variabilité interindividuelle (FI_H) : 10

Aucune donnée scientifique permettant de réduire la valeur par défaut n'étant disponible, la valeur de 10 est utilisée.

- Utilisation d'un point de départ ($FI_{B/L}$) : 1
- Insuffisance des données (FI_D) : 1

Un facteur d'incertitude global de 25 est donc utilisé pour la construction de la VTR.

3.8.7. Proposition de VTi pour une exposition répétée par voie orale et niveau de confiance

Les données disponibles pour une exposition répétée étant limitées (une seule étude disponible), le CES décide de construire une valeur toxicologique indicative (VTi) plutôt qu'une VTR pour laquelle il faudrait appliquer un FI_D supplémentaire. Une VTi est une valeur indicative moins robuste que la VTR présentant ainsi un niveau de confiance faible.

VTi = 0,0002 µg/kg pc/j, soit **0,2 ng/kg pc/j**

3.9. Proposition de VTR moyen terme par voie inhalée

Considérant l'absence de données humaines et animales, aucune VTR pour une exposition moyen terme n'a pu être proposée pour la voie inhalée. De plus, considérant le manque de données de toxicocinétique et la grande disparité des résultats de DL_{50} observés chez l'animal pour les différentes voies d'exposition, le CES n'a pas jugé pertinent de réaliser une extrapolation voie à voie.

3.10. Proposition de VTR moyen terme par voie cutanée

Considérant l'absence de données humaines et animales, aucune VTR pour une exposition moyen terme n'a pu être proposée pour la voie cutanée. De plus, considérant le manque de données de toxicocinétique et la grande disparité des résultats de DL_{50} observés chez l'animal pour les différentes voies d'exposition, le CES n'a pas jugé pertinent de réaliser une extrapolation voie à voie.

3.11. Conclusion et recommandations du CES

Une VTR aiguë par voie orale (exposition unique) a été élaborée pour la PLTX sur la base d'un NOAEL dérivé à partir de l'étude 2020a de Boente-Juncal *et al*. avec un niveau de confiance moyen-faible.

Une VTi moyen terme par voie orale a été élaborée après exposition répétée par voie orale sur la base d'un NOAEL dérivé à partir de l'étude 2020b de Boente-Juncal *et al.* avec, par définition, un niveau de confiance faible. Au regard de la base de données très limitée (une seule étude disponible), une VTi est construite par l'Anses lorsque toutes les conditions nécessaires à la construction d'une VTR ne sont pas réunies (insuffisance des données, doute sur le caractère néfaste de l'effet et/ou contraintes de temps et/ou de ressources). Cette approche pragmatique vise à répondre de façon transitoire à l'objectif de l'évaluation des risques sanitaires dans l'attente de données qualitatives et/ou quantitatives suffisantes et peut donc contribuer à répondre aux attentes des gestionnaires de risque en présence de situations d'exposition documentées. Cette VTi ne peut être utilisée que pour répondre à une situation et un contexte spécifiques qui ont justifié sa construction.

La durée d'application d'une VTR (ou VTi) moyen terme est habituellement définie sur une durée de 15 à 364 jours. Néanmoins, dans ce cas précis, une durée d'application de quelques semaines sera associée à cette VTi en cohérence avec la durée des épisodes de prolifération d'*Ostreopsis* généralement observés en France.

Le CES n'a pas pu élaborer de VTR court et moyen terme pour les voies respiratoire et cutanée pour la palytoxine du fait d'un manque de données pour ces voies.

Tableau 3 : VTR pour la palytoxine

Type de VTR (durée d'application)	Organisme constructeur (date)	Effet critique (étude clé)	Construction		VTR
			PoD	**FI**	
VTR aiguë par voie orale (exposition unique)	Anses (2023)	Ensemble des symptômes observés (léthargie, ataxie, douleurs abdominales, dyspnée, piloérection) Boente-Juncal *et al*. (2020a) : étude chez des souris exposées à une dose unique, période d'observation de 96 heures	NOAEL = 15 µg/kg <u>Ajustement allométrique</u> $NOAEL_{HED}$ = 15*(0,022/70)^{0,25} = 2 µg/kg/j	25 FI_{A-TK} = 1 FI_{A-TD} = 2,5 FI_{H} = 10 $FI_{B/L}$ = 1 FI_{D} = 1	**0,08 µg/kg/j** **Niveau de confiance : moyen-faible**
VTi moyen terme par voie orale (quelques semaines)	Anses (2023)	Ensemble des symptômes observés (léthargie, ataxie, douleurs abdominales, dyspnée, piloérection) Boente-Juncal *et al*. (2020b) : étude chez des souris exposées à des doses de PLTX pendant 28 jours	NOAEL = 0,03 µg/kg pc LOAEL = 0,1 µg/kg pc <u>Ajustement allométrique</u> $NOAEL_{HED}$ = 0,03*(0,027/70)^{0,25} = 0,004 µg/kg/j	25 FI_{A-TK} = 1 FI_{A-TD} = 2,5 FI_{H} = 10 $FI_{S=1}$ $FI_{B/L}$ = 1 FI_{D} = 1	0,0002 µg/kg pc/j soit **0,2 ng/kg/j** **Niveau de confiance : faible**
VTR court et moyen terme par voie respiratoire	Anses (2023)	**Absence de VTR du fait d'un manque de données**			
VTR court et moyen terme par voie cutanée	Anses (2023)	**Absence de VTR du fait d'un manque de données**			

Au vu des éléments détaillés dans cet avis, le CES recommande de réaliser des études complémentaires de toxicité par voie inhalée avec la PLTX et de réaliser des mesures de la concentration en PLTX dans les aérosols.

Au vu de l'hétérogénéité des valeurs qui empêche toute extrapolation voie à voie et du fait de l'absence de données toxicocinétiques, le CES recommande également que soient menées des études de toxicocinétique et de toxicité par administration répétée.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les propositions de VTR par voie orale construites pour la palytoxine.

L'Agence rappelle qu'une valeur toxicologique de référence (VTR) est un indice toxicologique qui permet de qualifier ou de quantifier un risque pour la santé humaine. Les VTR permettent d'évaluer des effets sanitaires éventuels consécutifs d'une exposition à des substances. Elles peuvent être utilisées dans le cadre des évaluations quantitatives de risques sanitaires (EQRS) réalisée, à l'échelle populationnelle, dans un contexte d'exposition donné et aider ainsi au choix de mesures de gestion des risques.

Pr Benoit Vallet

MOTS-CLÉS

Valeur toxicologique de référence, VTR, toxines marines, ostreopsis, palytoxine, aiguë, toxicité répétée.

Toxicological reference value, TRV, marine toxins, ostreopsis, palytoxin, acute, repeated toxicity

CITATION SUGGÉRÉE

Anses. (2023). Avis relatif à l'élaboration d'une VTR pour la palytoxine. (saisine 2021-SA-212). Maisons-Alfort : Anses, 20 p.

Valeurs toxicologiques de référence (VTR)

Élaboration de VTR pour la palytoxine.

Saisine « 2021-SA-0212 »

RAPPORT
d'expertise collective

Comité d'experts spécialisé

« Valeurs sanitaires de référence »

Mars 2023

AGENCE NATIONALE DE SÉCURITÉ SANITAIRE de l'alimentation, de l'environnement et du travail
14 rue Pierre et Marie Curie 94701 Maisons-Alfort Cedex
Tél : +33 (0)1 49 77 13 50 — www.anses.fr

ANSES/FGE/0035 [version h] – PR1/ANSES/9

Citation suggérée

Anses. (2023). Élaboration d'une VTR pour la palytoxine. (saisine 2021-SA-212). Maisons-Alfort : Anses, 68 p.

Mots clés

Valeur toxicologique de référence, VTR, toxines marines, ostreopsis, palytoxine, aiguë, toxicité répétée.

Key words

Toxicological reference value, TRV, marine toxins, ostreopsis, palytoxin, acute, repeated toxicity.

Présentation des intervenants

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

COMITE D'EXPERTS SPECIALISE

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

CES « Valeurs sanitaires de référence » (CES VSR) (2021-2023) – 20 janvier 2023

Président

M. Fabrice MICHIELS – Médecin du travail / toxicologue au Service de prévention et santé au travail de Corrèze et de Dordogne (SPST 19-24) – Compétences : Médecine du travail, toxicologie

Vice-président

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

Membres

M. Luc BELZUNCES – Directeur de Recherche et Directeur du Laboratoire de Toxicologie Environnementale à l'INRAE – Compétences : toxicologie générale, neurotoxicologie, écotoxicologie, chimie analytique, évaluation des risques

Mme Michèle BISSON – Toxicologue Responsable d'étude à l'INERIS – Compétences : pharmacien toxicologue, VTR, évaluation des risques sanitaires

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

M. François CLINARD - Épidémiologiste à l'Agence Santé Publique France – Compétences : pharmacien toxicologue, épidémiologie, évaluation des risques sanitaires

Mme Fatiha EL-GHISSASSI – Scientifique, Programme des Monographies. Evidence Synthesis and Classification Branch. Centre International de Recherche sur le Cancer - Compétences : biochimie spécialiste en cancérogénèse et génotoxicité

M. Claude EMOND – Professeur associé - École de santé publique, Université de Montréal - Département de santé environnementale et santé au travail. – Compétences : toxicologie, modèle PBPK, toxicocinétique, nanotoxicologie, perturbateurs endocriniens

M. Robert GARNIER – Médecin toxicologue, Paris - Compétences : toxicologie médicale, santé au travail, santé environnementale

Mme Perrine HOET – Professeur à l'Université Catholique de Louvain. IREC – Compétences : médecine du travail, toxicologie professionnelle et environnementale – démission en février 2023.

M. Kevin HOGEVEEN – Toxicologue, Anses – Fougères, Toxicologie des Contaminants – Compétences : toxicologie, génotoxicité, hépatotoxicité, toxicologie *in vitro*

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

M. Frédéric LIRUSSI – Professeur des Universités– Praticien Hospitalier (PU-PH) à l'UFR des Sciences de Santé & CHRU de Besançon - Compétences : toxicologie Clinique, toxicologie analytique, immunité Innée, reprotoxicité

M. Luc MULTIGNER – Directeur de recherche, INSERM U1085 - IRSET – Compétences : épidémiologie, perturbateurs endocriniens, pathologies des fonctions et des organes de la reproduction

Mme Nadia NIKOLOVA-PAVAGEAU – Conseiller médical à l'INRS – Compétences : médecine du travail, toxicologie médicale, IBE

M. Benoît OURY – Responsable d'études à l'INRS – Compétences : Métrologie atmosphérique, Air des lieux de travail, évaluation expositions professionnelles

M. Henri SCHROEDER – Maître de Conférence à la Faculté des Sciences et Technologies de l'Université de Lorraine –Département Neurosciences et Biologie Animale et unité INSERM U1256 Nutrition, Génétique et Exposition aux Risques environnementaux - Pharmacien neurobiologiste - Compétences : neurotoxicité, polluants environnementaux, comportement animal, développement cérébral, exposition périnatale

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

M. Jérôme THIREAU – PhD, Chargé de recherche au CNRS - Compétences : physiologie animale, électrophysiologie, biologie cellulaire, cardiotoxicité

Mme Maeva WENDREMAIRE – Maître de conférences à l'Université de Bourgogne – Compétences : toxicologie, reprotoxicité, pharmacologie, toxicologie analytique

RAPPORTEURS

M. Frédéric LIRUSSI – Professeur des Universités– Praticien Hospitalier (PU-PH) à l'UFR des Sciences de Santé & CHRU de Besançon - Compétences : toxicologie clinique, toxicologie analytique, immunité Innée, reprotoxicité

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

M. Jérôme THIREAU – PhD, Chargé de recherche au CNRS - Compétences : physiologie animale, électrophysiologie, biologie cellulaire, cardiotoxicité

PARTICIPATION ANSES

Coordination scientifique

M. François POUZAUD – coordinateur d'expertise scientifique – Anses

Contribution scientifique

Mme Carole CATASTINI – coordinatrice d'expertise scientifique – Anses

Mme Nathalie ARNICH – Adjointe à la cheffe de l'unité de l'Évaluation des risques liés aux aliments – Direction de l'Évaluation des Risques - Anses

Secrétariat administratif

Mme Patricia RAHYR – Anses

SOMMAIRE

Présentation des intervenants **3**
Sigles et abréviations **8**
Liste des tableaux **10**
Liste des figures **11**
1 Contexte, objet et modalités de réalisation de l'expertise **12**
1.1 Contexte 12
1.2 Objet de la saisine 13
1.2.1 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation 15
1.2.2 Méthode de travail 15
1.3 Prévention des risques de conflits d'intérêts 16
2 Informations générales **17**
2.1 Palytoxine (PLTX) 17
2.2 Propriétés physico-chimiques 17
2.3 Classification 18
3 Synthèse des données toxicologiques **19**
3.1 Toxicocinétique 19
3.2 Toxicité aiguë 19
3.2.2 Irritation cutanée et oculaire 28
3.2.3 Sensibilisation 28
3.3 Toxicité répétée et chronique 29
3.3.1 Données chez l'Homme 29
3.3.2 Données chez l'animal 29
3.4 Effets sur la reproduction et le développement 32
3.5 Génotoxicité 32
3.6 Cancérogénicité 32
3.7 Mécanisme d'action 33
3.8 Populations sensibles 36
4 Recueil des valeurs toxicologiques de référence **37**
4.1 VTR court terme 37
4.1.1 Voie orale 37
4.1.2 Voie inhalée 37
4.1.3 Voie cutanée 37
4.2 VTR moyen et long terme par voie orale 37
5 Proposition de VTR court terme par voie orale **38**
5.1 Choix de l'effet critique 38

5.2 Analyse des VTR court terme existantes 38
5.3 Choix de l'étude clé et du point de départ 38
5.4 Ajustement allométrique 39
5.5 Choix des facteurs d'incertitude 40
5.6 Proposition de VTR court terme par voie orale 40
5.7 Niveau de confiance 40
6 Proposition de VTR court terme par voie inhalée 42
7 Proposition de VTR court terme par voie cutanée 43
8 Proposition de VTR moyen terme par voie orale....44
8.1 Choix de l'effet critique....44
8.2 Analyse des VTR moyen terme existantes....44
8.3 Choix de l'étude clé et du point de départ 44
8.4 Ajustement allométrique 45
8.5 Choix des facteurs d'incertitudes 45
8.6 Proposition de VTi pour une toxicité répétée par voie orale 46
9 Proposition de VTR moyen terme par voie inhalée....47
10 Proposition de VTR moyen terme par voie cutanée....48
11 Conclusion et recommandations du CES 49
12 Bibliographie....52
Annexe 1 : Lettre de saisine 61
Annexe 2 : Modélisation benchmark dose (BMD) pour une exposition court terme. 65

Sigles et abréviations

ARfD	Acute reference dose
ARNm	Acide ribonucléique messager
ALAT	Alanine aminotransférase
Anses	Agence nationale de sécurité sanitaire alimentation environnement travail
ASAT	Aspartate aminotransférase
ATP	Adénosine triphosphate
BMD	Benchmark Dose
BMDL	Limite inférieure de l'intervalle de confiance de la benchmark dose
BMDU	Limite supérieure de l'intervalle de confiance de la benchmark dose
BMR	Benchmark Response
CAPTV	Centre anti-poison et de toxicovigilance
CCTV	Comité de coordination de toxicovigilance
CE	Commission européenne
CE50	Concentration efficace 50
CES	Comité d'Experts Spécialisés
CLP	Classification, Labelling, Packaging
CPK	Créatine phosphokinase
DGAL	Direction générale de l'alimentation
DGS	Direction générale de la santé
DL_{50}	Dose létale 50
DMBA	Dimethylbenzoanthracene
EFSA	European food safety authority
HED	Dose équivalente humaine (= Human Equivalent Dose)
GT	Groupe de travail
FI	Facteur d'incertitude (= Uncertainty Factor)
FI_A	Facteur d'incertitude inter-espèces
FI_{A-K}	Composante toxicocinétique du facteur d'incertitude inter-espèces
FI_{A-D}	Composante toxicodynamique du facteur d'incertitude inter-espèces
FI_D	Facteur d'incertitude lié au manque de données
FI_H	Facteur d'incertitude interindividuel
$FI_{L/B}$	Facteur d'incertitude lié à l'utilisation d'un LOAEL ou d'une BMD
FI_S	Facteur d'incertitude lié à la transposition subchronique à chronique
Ifremer	Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer
IC95%	Intervalle de confiance à 95%
IP	Intra-péritonéale
IV	Intra-veineuse
LDH	Lactate deshydrogénase
LOAEL	Lowest Observed Adverse Effect Level (= dose minimale entraînant un effet néfaste observé)
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level (= dose maximale n'entraînant pas d'effet néfaste observé)
NOS	Oxyde nitrique synthase
NOX	NADPH oxidase
OA	Okadaic acid
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORL	Oto-Rhino-Laryngé
PBS	Phosphate Buffered saline
PLTX	Palytoxine
PoD	Point de départ (= point of departure)
Rephy	Réseau d'Observation et de Surveillance du Phytoplancton et de l'Hydrologie dans les eaux littorales
RMN	Résonance magnétique nucléaire

TTX	Tétrodotoxine
UV	Ultra-violet
VTi	Valeur toxicologique indicative
VTR	Valeur toxicologique de référence

Liste des tableaux

Tableau 1 : ARfD de l'EFSA (2009) 37
Tableau 2 : Analyse critique des études court terme 38
Tableau 3 : VTR pour la palytoxine 50

Liste des figures

Figure 1: Structure de la palytoxine 18
Figure 2: Schéma du fonctionnement de la pompe Na+/K+ ATPase (Alberts *et al*., 2008) ...34

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

1.1 Contexte

Au cours des dernières décennies, les dinoflagellés (eucaryotes unicellulaires) du genre *Ostreopsis* ont été identifiés dans les zones côtières de plusieurs pays tels que l'Albanie, la Croatie, Chypre, l'Espagne, la France, la Grèce, l'Italie et le Portugal (Accoroni et Totti 2016 ; Aligizaki *et al.,* 2008 ; Amzil *et al.,* 2012 ; Ciminiello *et al.,* 2006 ; Del Favero *et al.,* 2012 ; Fraga *et al.,* 2017 ; Funari, Manganelli et Testai, 2015 ; Santos *et al.,* 2019). Ces microalgues benthiques peuvent causer des intoxications humaines, lorsqu'elles sont présentes dans les embruns, l'eau de mer (Patocka *et al.* 2018). L'exposition peut se faire par voie respiratoire (contact avec les embruns lors de promenade, de surveillance des plages, des activités de baignade et nautiques, *et*c.), par contact cutané avec de l'eau de mer ou des macroalgues (lors des activités de baignade et/ou nautiques) ou encore par ingestion (d'eau de mer lors de la baignade, pratique d'activité nautique ou en cas de consommation de produits de la mer contaminés par des toxines produites par *Ostreopsis* spp). Des manifestations cliniques telles que toux, rhinorrhée, irritations de la sphère ORL et des yeux, céphalées, fièvre, difficultés respiratoires, nausées, vomissements, diarrhées, douleurs abdominales, myalgies, rougeurs ou démangeaisons sont alors observées chez les personnes exposées à *Ostreopsis* (Berdalet *et al.,* 2022). Certains rapports de cas font aussi état de troubles cardiovasculaires (Hoffmann *et al*., 2008 ; Deeds *et al*., 2010 ; Wu *et al*., 2014).

Les proliférations d'*Ostreopsis* sont aussi liées à des mortalités massives de certains invertébrés (Sansoni *et al*., 2003 ; Totti *et al*., 2010 ; Ciminiello *et al*., 2006, 2012, 2014). Ces toxines ont également été détectées dans certains produits de la mer (Aligizaki *et al*., 2008 ; Bire *et al*, 2013, 2015 ; Brissard *et al*., 2014) issus de la mer Méditerranée et peuvent présenter par conséquent un risque potentiel d'intoxication alimentaire chez l'Homme (Tubaro *et al*., 2011).

En France, la présence d'*Ostreopsis* est identifiée de façon récurrente sur les côtes méditerranéennes depuis plusieurs années (observations de l'Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer (Ifremer) dans le cadre du Réseau d'Observation et de Surveillance du Phytoplancton et de l'Hydrologie dans les eaux littorales ou Rephy). Durant l'été 2021, un épisode important de prolifération d'*Ostreopsis* a également été signalé sur la côte basque de fin juillet à fin septembre 2021. Ce sont près de 800 personnes[1] qui ont présenté des symptômes d'intoxication après avoir fréquenté des plages de ces côtes (Paradis et Labadie, 2022). Quelques cas d'intoxications similaires avaient déjà été signalés pendant l'été 2020. Il est donc possible que ce phénomène émergent devienne récurrent et puisse s'amplifier sur la côte atlantique.

Les premières investigations menées par l'Ifremer ont mis en évidence la présence de deux espèces de microalgues du genre *Ostreopsis* : *O*. cf. *siamensis* et *O*. cf. *ovata* (Amzil *et al.,* 2012). Si *O*. cf. *siamensis* est observée dans la zone depuis 2018, la détection d'*O*. cf. *ovata* dans cette partie du golfe de Gascogne est une première sachant que la prolifération de cette espèce est connue pour provoquer des troubles tels que ceux observés depuis les années 2000 en Méditerranée.

[1] Nombre de cas recensés par le centre antipoison (CAP) de Bordeaux fin septembre 2021

O. cf. *ovata* est connue pour produire de la palytoxine (PLTX) sous forme de plusieurs congénères (7 actuellement décrits) ainsi que des analogues de cette molécule, les ovatoxines (Amzil *et al.,* 2012 ; Brissard *et al.,* 2015 ; Ciminiello *et al.,* 2008 ; Ciminiello *et al.,* 2012 ; Ciminiello *et al.,* 2010 ; García-Altares *et al.,* 2015 ; Gemin, 2020 ; Tartaglione *et al.,* 2017). Ces molécules pourraient être à l'origine des symptômes observés chez l'Homme (Illoul *et al.,* 2012 ; Tichadou *et al.,* 2010) d'autant plus que certaines d'entre elles ont été détectées dans les aérosols (Ciminiello *et al.,* 2014 ; Medina-Pérez *et al.,* 2021).

1.2 Objet de la saisine

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

L'objectif de cette saisine est, d'une part, la mise à jour des connaissances relatives aux microalgues du genre *Ostreopsis* pour lesquelles l'Agence avait déjà rendu deux avis en 2007 et 2008 (Afssa, 2007 et 2008) et, d'autre part, l'établissement de recommandations spécifiques à la côte atlantique ainsi que, si cela s'avère opportun, la mise à jour des recommandations spécifiques à la côte méditerranéenne établies en 2007 et 2008.

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

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

- *Existe-t-il dans d'autres pays des méthodes de détection rapides qui pourraient être mises en œuvre pour identifier la toxine en cause lors d'une épidémie ?*
- *En matière de sécurité des travailleurs, quelles sont les recommandations spécifiques pour éviter une exposition chronique en cas d'efflorescence ?* »

Dans le cadre du contrat d'expertise établi le 20 décembre 2021, les questions de la saisine ont été reformulées par l'Anses selon deux axes : le premier concerne le bilan des connaissances et le second l'élaboration de recommandations :

■ <u>État des connaissances</u> :

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

■ Recommandations (les questions qui pourront être traitées vont dépendre du bilan de l'état des connaissances réalisé dans la première partie) :

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

- recommandations pour la surveillance d'*Ostreopsis* sur la côte basque (points de prélèvements, type de support (eau, macroalgues, autres), fréquence, *etc.*), est-il possible d'identifier des zones / périodes à risque sur la côte basque / atlantique?
- identification des risques pour les différents usagers de la mer selon les différentes voies d'exposition (ingestion, inhalation et, contact cutanéo-muqueux) ;
- préconisations spécifiques pour les professionnels et la ou les population(s) sensible(s) (asthmatiques, *etc.*).

Pour mener son expertise, l'Agence doit aborder les différentes voies d'exposition à *Ostreopsis* et à ses toxines, à savoir :

- l'inhalation d'embruns contaminés ;
- l'ingestion de produits de la mer ou d'eau contaminés ;
- le contact cutané avec de l'eau contaminée ou des macroalgues (support des *Ostreopsis*).

Le présent rapport traite uniquement de l'actualisation du corpus documentaire relatif à la toxicité des microalgues du genre Ostreopsis et le cas échéant, de la sélection ou construction de VTR court et moyen terme pour les voies orale, respiratoire et cutanée pour la toxine de référence, à savoir la palytoxine.

1.2.1 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

L'Anses a confié au groupe de travail (GT) « *Ostreopsis* », créé après un appel public à candidatures, rattaché au comité d'experts spécialisé (CES) « Eaux », l'instruction de cette saisine.

Le CES « Valeurs sanitaires de référence » (VSR) a été mandaté pour proposer des VTR par voies orale, respiratoire et cutanée pour la palytoxine. Des rapporteurs ont été nommés pour analyser les données sur la toxicité de la substance. Les travaux d'expertise ont été soumis au CES VSR tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques et ont été validés en séance du 9 mars 2023. Le rapport tient compte des observations et des 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) ».

1.2.2 Méthode de travail

Une valeur toxicologique de référence, ou VTR, est un indice toxicologique qui permet de qualifier ou de quantifier un risque pour la santé humaine. Elle établit le lien entre une exposition à une substance toxique et l'occurrence d'un effet sanitaire indésirable. Les VTR sont spécifiques d'une durée d'exposition (court, moyen et long terme) et d'une voie d'exposition (orale, cutanée ou respiratoire).

Afin de construire des VTR, l'Anses s'appuie sur son guide d'élaboration des VTR (Anses, 2017).

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

- recenser et analyser les données de toxicité disponibles, sur la base d'études épidémiologiques et/ou expérimentales,
- identifier le ou les organes cibles et l'effet critique ;
- identifier l'hypothèse de construction, à seuil ou sans seuil de dose, en fonction du mode d'action de la substance
- choisir une étude clé de bonne qualité scientifique permettant généralement d'établir une relation dose – réponse ;
- définir un point de départ (PoD) chez l'Homme ou l'animal à partir de cette étude, éventuellement dans le cas d'un PoD obtenu chez l'animal, l'ajuster à l'Homme ;
- appliquer de facteurs d'incertitude à ce PoD.

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

La construction des VTR diffère en fonction des connaissances ou des hypothèses formulées sur les mécanismes d'action des substances. Actuellement, l'hypothèse par défaut est de considérer une relation monotone entre l'exposition, ou la dose, et l'effet, ou la réponse. En l'état actuel des connaissances et par défaut, on considère généralement que, pour les effets non cancérogènes, la toxicité ne s'exprime qu'au-delà d'un seuil de dose (Anses, 2017).

Afin de recenser les données de toxicité disponibles sur la palytoxine, et les autres toxines potentiellement produites par les cellules d'Ostreopsis, une revue bibliographique a été réalisée à partir de la base de données Pubmed et Scopus, entre janvier et mars 2022, Cette recherche bibliographique a permis d'identifier 391 références, 78 études ont été retenues et 9 références complémentaires ont ensuite été ajoutées. Concernant plus spécifiquement la construction des VTR relatives à la palytoxine, dix études ont été identifiées et discutées par les experts à la suite de la première recherche bibliographie.

1.3 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 publiées sur le site internet https://dpi.sante.gouv.fr/.

2 Informations générales

2.1 Palytoxine (PLTX)

La palytoxine (PLTX) a été isolée pour la première fois en 1971 à partir du cnidaire hexacoralliaire *Palythoa toxica* (corail tropical) (Moore et Scheuer, 1971). Sa structure a été élucidée par rayons-X et résonance magnétique nucléaire (RMN) (Moore et Bartolini, 1981; Uemura *et al.,* 1981a, 1981b). Quatre analogues mineurs de la PLTX ont également été isolés à partir de *Palythoa tuberculosa* : homo-palytoxine, bishomo-palytoxine, néo-palytoxine et 73-déoxy-palytoxine (Uemura *et al.,* 1985), ainsi que la 42-hydroxy-palytoxine (Ciminiello *et al.,* 2009), dont la structure a été déterminée à partir des échantillons de *Palythoa tuberculosa* et de *Palythoa toxica* prélevés au large de la côte hawaïenne.

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

2.2 Propriétés physico-chimiques

La PLTX est une molécule non protéique de haut poids moléculaire (2680 Da), de formule brute $C_{129}H_{223}N_3O_{54}$. Elle est composée d'une longue chaîne aliphatique, partiellement insaturée, comprenant de nombreux éthers cycliques (polyéther), deux fonctions amides et 42 groupements hydroxyles, ainsi que la présence d'une fonction amine primaire qui confère à la molécule un caractère basique (Figure 1). Sa masse molaire est de 2680 g/mol. La PLTX se caractérise par un spectre d'adsorption ultraviolet (UV) avec deux maxima d'absorption à 233 et 263 nm dus à la présence de deux groupements chromophores (Riobó, Paz et Franco 2006). En spectrométrie de masse, la fragmentation en C_8-C_9 de la molécule produit un ion fragment majoritaire et caractéristique, appelé fragment A ([M - fragment B - H_2O]$^+$) correspondant à un rapport masse sur charge (m/z) de 327 (Ciminiello *et al.,* 2006).

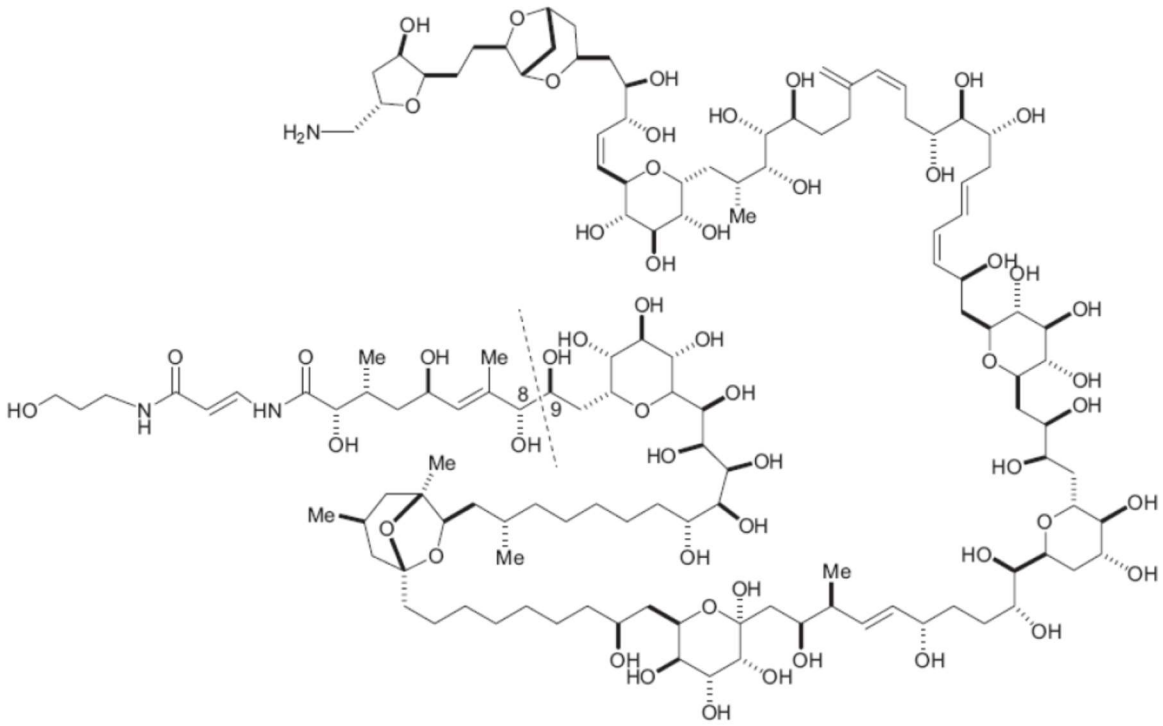


Figure 1 : Structure de la palytoxine

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

2.3 Classification

Au titre du règlement (CE) n°1272/2008 (CLP), la PLTX isolée de *Palythoa Tuberculosa* (CAS n°77734-91-9) ne possède pas de classification harmonisée.

3 Synthèse des données toxicologiques

La toxicité de la PLTX a été étudiée chez de nombreuses espèces animales (très majoritairement rongeurs, mais également lagomorphes, chiens, singes) et cela pour plusieurs voies d'administration. Les données disponibles dans la littérature sont hétérogènes en raison des différentes méthodologies employées, de l'origine de la PLTX et des différences de souche génétique, de sexe et d'âge des animaux utilisés. La cinétique d'apparition, la nature et l'intensité des symptômes diffèrent en fonction des voies d'administration considérées.

En considérant que l'exposition humaine à la PLTX se fait très majoritairement par inhalation d'aérosols toxiques et par ingestion de fruits de mer contaminés, il convient de retenir ces deux voies d'exposition pour l'élaboration de VTR. Récemment, des données expérimentales chez l'animal sur la toxicité de la PLTX administrée par inhalation et par voie orale ont été publiées.

L'exposition par voie cutanée et par voie oculaire ne doit cependant pas être sous-estimée, notamment chez les aquariophiles amateurs et/ou professionnels qui peuvent être exposés de façon plus intense à la fois pour la voie inhalée et cutanée.

3.1 Toxicocinétique

Peu de données ont été publiées sur les paramètres cinétiques associés à une exposition à la PLTX. Compte tenu des atteintes systémiques observées lors des études de toxicité par inhalation et par gavage, il semble que la toxine puisse passer les barrières pulmonaire et intestinale et se distribuer dans différents organes. Cependant, il n'est pas possible d'évaluer si ce passage des barrières pulmonaire et intestinale s'effectue en l'absence d'altération de ces épithéliums. En effet, les études réalisées sur des modèles *in vitro* d'absorption intestinale montrent une faible résorption digestive suggérant une faible biodisponibilité de la PLTX par voie orale (Fernandez *et al*., 2013). Des expériences *in vitro* sur cellules de l'épithélium intestinales, réalisées dans le cadre du projet ANR Ocean 15, n'ont pas permis de déterminer les paramètres toxicocinétiques de la PLTX en raison des altérations de l'intégrité de la monocouche épithéliale observées avec des concentrations très faibles dès 0,25 ng/mL (environ 0,1 nM) après 24h d'exposition.

Quelle que soit la voie d'administration, aucune donnée sur le passage des barrières hémato-encéphalique, testiculaire et placentaire n'est disponible. Il en est de même pour le métabolisme et pour l'élimination de la PLTX.

3.2 Toxicité aiguë

3.2.1.1 Données chez l'Homme

- **Voie orale**

Il existe peu d'observations cliniques disponibles liées à une intoxication à la PLTX par la consommation de poissons ou de crustacées. Celles-ci sont principalement issues de la consommation d'espèces tropicales en Asie.

- **Voies respiratoire et cutanée**

Les données disponibles sont principalement issues d'observations cliniques liées à une exposition lors d'activité de nettoyage d'aquariums contenant des coraux mous de l'espèce zoanthide, mais également lors d'activité sur la plage (CAPTV, 2022 ; Deeds *et al*., 2018 ; Hoffman *et al*., 2008 ; CCTV, 2018). Les symptômes présentés sont principalement des irritations oculaires, cutanées et respiratoires, et/ou des symptômes pseudo-grippaux : céphalées, myalgies, hyperthermie, tremblements, nausées, vomissement.

3.2.1.2 Données chez l'animal

- **Voie orale**

Wiles *et al*. ont exposé des rats à une solution aqueuse de PLTX (solution aqueuse avec 50% éthanol) par administration intra-gastrique à un volume constant de 5 mL/kg à des concentrations de 0,5 ; 1 ; 2 et 5 µg/mL (Wiles *et al*., 1974). Tous les animaux ont été observés pendant un minimum de 48 heures pour suivre l'apparition des signes cliniques et la mortalité. Cette étude montre que la dose létale 50 (DL_{50}) à 24 heures serait supérieure à 40 µg/kg pc, sans signe de toxicité additionnel ou de mortalité ayant lieu sur une période de 72 heures. Peu ou pas de signes toxiques ont été observés avec des doses jusqu'à 10 µg/kg pc et pour des doses plus fortes de 20 et 40 µg/kg pc, avec seulement 1 des 4 rats qui est décédé (Wiles *et al*., 1974). Dans trois études plus récentes la DL_{50} de la PLTX à 24 heures chez la souris par gavage est estimée à 510 µg/kg pc ($IC_{95\%}$ = 311-809 µg/kg pc), 599 µg/kg pc ($IC_{95\%}$ = 508-707 µg/kg pc) et 767 µg/kg pc ($IC_{95\%}$ = 549-1039 µg/kg pc), respectivement (Munday, 2008 ; Boente-Juncal *et al*., 2020a ; Sosa *et al*., 2009). La toxicité (DL50) de la PLTX pour les souris serait encore plus faible lors d'une exposition par ingestion volontaire (mélangée à de la nourriture) par comparaison avec une exposition par voie intra-péritonéale ou par gavage, puisqu'aucun effet n'a été observé à une dose de 2500 µg/kg pc (Munday, 2006). Il n'y a pas de relation entre la dose administrée et la durée de survie des individus exposés (Sosa *et al*., 2009).

Les auteurs concluent que la toxicité de la PLTX par exposition intra-gastrique est environ 1/200 celle par voie intraveineuse (IV).

Sosa *et al*. ont exposé, par gavage (10 mL/kg), des souris femelles CD-1 (n = 5/dose, 18-20 g, âgées de 4 semaines) à des doses uniques de PLTX (isolée de *P. tuberculosa*, Wako, pureté >90%) de 0, 300, 424, 600, 848, 1200 et 1697 µg/kg pc (dissoute dans du tampon phosphate (PBS)), avec un suivi pendant 24 heures (Sosa *et al*., 2009). Les symptômes les plus fréquents observés sur les animaux décédant pendant la période d'observation sont : des spasmes (localisation non précisée) (86%), une paralysie impliquant principalement les membres postérieurs (80%), une détresse respiratoire (70%), un comportement de grattage (57%), et des sauts (50%). Le comportement de grattage est observé de manière récurrente et à toutes les doses (hormis pour les non-exposés). Ces symptômes sont comparables à ceux observés après exposition par voie intrapéritonéale (IP). Le caractère neurotoxique de la PLTX est attesté par ses effets indirects (sans que les mécanismes soient clairement élucidés) sur la fonction contractile des muscles squelettiques, ainsi que sur les muscles respiratoires. Les auteurs ont également réalisé des analyses sanguines ainsi que des examens anatomopathologiques sur de très nombreux organes. Des altérations histologiques sur différents organes (estomac, foie, pancréas, rein) ont également été observées à la fois sur les souris décédées lors de la période de 24 heures d'observation et sur les souris ayant survécu. En particulier, l'analyse histologique des souris mortes a montré quasi

systématiquement des effets au niveau du foie et du pancréas, tels qu'une forte diminution, voire une absence, de glycogène hépatique. Au niveau pancréatique, il y avait une diminution des sécrétions enzymatiques des acini glandulaires. Chez les souris survivantes, les effets majeurs ont été observés sur l'estomac non glandulaire avec une inflammation aiguë (minimale à modérée) des muqueuses et sous-muqueuses à partir de la dose de 424 µg/kg pc. Chez la plupart des souris mortes pendant la période d'observation et ayant reçu une dose supérieure ou égale à 600 µg/kg pc, des zones rouges étaient présentes dans la muqueuse de l'estomac non glandulaire. Il n'y a pas eu d'effet sur le poids des animaux, ni sur la formule leucocytaire quelle que soit la dose de PLTX testée. En revanche, à 600 µg/kg/pc et au-delà, une augmentation de la créatine phosphokinase (CPK) et de la lactate déshydrogénase (LDH) plasmatiques a été observée, ainsi que de l'aspartate-aminotransférase (ASAT) à partir de 848 µg/kg pc et de l'alanine-aminotransférase (ALAT) seulement à 848 µg/kg pc. Il n'a pas été observé d'effet sur la valeur de la créatinine plasmatique. Il n'y a pas eu de modification macroscopique des muscles cardiaques et squelettiques chez les souris ayant reçu une dose orale de PLTX jusqu'à 1697 µg/kg pc. Des modifications ultra-structurales, comme l'agrégation des mitochondries et la dégénérescence des fibres musculaires ont, en revanche, été observées en microscopie électronique de manière dose dépendante. Aucun impact sur la mortalité ou sur les niveaux en fréquence et en sévérité des altérations histologiques n'a été relevé lorsque la période de jeûne avant gavage a augmenté de 3 à 16 heures, aux doses testées de 848 et 1200 µg/kg pc. D'après les symptômes, les muscles squelettiques et cardiaque sont ciblés par la toxine. Sur la base des données de mortalité et d'une inflammation de l'estomac objectivée par histologie à partir de la dose de 424 µg/kg, les auteurs proposent un NOAEL[2] de 300 µg/kg pc pour la PLTX après administration orale aiguë chez la souris.

Ito et Yasumoto ont exposé des souris mâles ICR (âgées de 3-4 semaines, n = 4), sans jeûne alimentaire, à de la PLTX d'origine commerciale (Wako, sans mention de la pureté) administrée par gavage dans une solution saline de 200 µg/kg pc et ont suivi la mortalité sur 24 heures (Ito et Yasumoto, 2009). Un groupe témoin a été comparé au groupe traités réalisé (n = 6). La PLTX a également été testée à 200 et 500 µg/kg pc (n = 4) avec un suivi de 2 heures. La dose de 200 µg/kg pc n'a pas été létale. L'analyse post-mortem des souris a révélé, à cette dose, des lésions légères de l'estomac, de l'intestin grêle, des poumons et des reins. Les auteurs notent également une légère accumulation de suc (ou sécrétions) gastrique dans l'estomac. Ces effets, qualifiés par les auteurs d'inflammatoires, sont apparus assez rapidement (en 2 heures). Les auteurs proposent, sur la base de ces observations, un LOAEL[3] de 200 µg/kg pc pour la PLTX, en contraste avec l'étude précédente.

Dans cette étude, les auteurs ont cherché à comprendre pourquoi la PLTX est faiblement létale lorsqu'elle est administrée seule par voie orale (DL_{50} > 500 µg/kg pc dans toutes études publiées). Tout d'abord, des composants alimentaires ou des lipides favorisant l'absorption de la PLTX ont été ajoutés à la solution de la PLTX (200 µg/kg pc), diluée dans 0,3 mL d'extraits de crabe (*Ovalipes punctatus*) ou de maquereaux (*Scomber australasicus*) ou dans de l'huile de trioléine, de la lécithine, de la lysolécithine ou de l'acide désoxycholique (n = 5). Il n'a été constaté ni signe anormal, ni létalité dans les 24 heures suivant l'administration. Par ailleurs, le fait de diluer la toxine dans de l'eau contenant des extraits de crabes ou de maquereaux (matrices alimentaires fréquentes de nourriture contaminées) n'a pas modifié la toxicité de la PLTX. Enfin, sur des souris présentant un ulcère gastrique (n = 6), la toxicité de la PLTX

[2] No Observed Adverse Effect Level (= dose sans effet néfaste observé)
[3] Lowest Observed Adverse Effect Level (= dose minimale entraînant un effet néfaste observé).

(200 µg/kg pc ; 0,3 M HCl dans 60% éthanol pendant 1 heure) n'était pas modifiée. Ces données suggèrent que ni ces composants alimentaires, ni la présence préalable d'un ulcère ne modifient la toxicité, ou l'absorption de la PLTX.

Enfin, la PLTX a été administrée à des souris par voie sublinguale, à une dose d'environ 200 µg/kg pc (176 à 235 µg/kg pc). Cette exposition était proposée pour mimer une intoxication alimentaire, au cours de laquelle la toxine entre en contact avec les tissus de la bouche et de l'œsophage, avant d'atteindre le reste du tractus digestif. La toxine a été déposée dans un volume très faible (2 µL) pour éviter qu'elle soit avalée. Dans ce paradigme expérimental, les souris étaient « inactives » et présentaient une hyperventilation. L'examen post-mortem des organes a révélé un léger saignement au niveau des poumons, apparu après 30 minutes, suivi d'une inflammation interstitielle pendant 1,5-8 heures, puis de la destruction des alvéoles pulmonaires en 8-24 heures. Les tissus gastro-intestinaux apparaissaient jaunâtres, fragiles et gonflés à 30 min. Les villosités de l'intestin grêle étaient lésées au niveau apical, et présentaient une sécrétion de mucus. Au niveau des reins, les auteurs ont observé une atrophie glomérulaire après 8-24 heures. La PLTX, administrée au niveau de la cavité buccale, a atteint la circulation générale et les organes susmentionnés pour induire des altérations structurales et fonctionnelles bien plus sévères qu'après administration *per os* ce qui suggère que la PLTX est partiellement dégradée lors de son passage dans le tractus digestif. Dans la même étude, lorsque la PLTX était administrée par voie sublinguale à plusieurs reprises (165 µg/kg pc/j pendant deux ou trois jours), les souris se grattaient légèrement et ne présentaient aucun signe de paralysie, puis développaient progressivement une cyanose, et s'affaiblissaient. Les auteurs proposent qu'elles puissent être victimes d'une dysfonction cardiaque (insuffisance ou défaillance). À l'examen histologique, les poumons présentaient des lésions, comparables à celles observées en exposition unique. Les lésions liées à l'œdème du tractus gastro-intestinal étaient plus importantes que lors d'une administration unique. Dans l'estomac, les cellules épithéliales qui bordent la lumière et les glandes étaient exfoliées, et le tissu conjonctif abrasé.

Dans l'étude de Boente-Juncal *et al*., des souris femelles Swiss (n = 3 à 9, 18-21 g, âgées de 4 semaines au début de l'expérience) ont été exposées par gavage à des doses de PLTX (extraite de *P. tuberculosa*, Wako, pure à 88,9%) de 0, 15, 36, 100, 350, 500, 750, 1200 µg/kg pc (en solution saline) (Boente-Juncal *et al*., 2020a). Les animaux ont été observés toutes les 2 heures jusqu'à la fin de la période d'observation (96 heures). L'étude de létalité a permis de déterminer une DL_{50} de 599,3 µg/kg pc ($IC_{95\%}$ = 508-707 µg/kg pc), proche des valeurs des deux études précédentes. À dose létale (1200 µg/kg pc), les souris mouraient dans les deux heures après administration par gavage de la toxine et présentaient des signes de détresse (ataxie, léthargie, cyphose, cyanose, dyspnée, pilo-érection) et des douleurs abdominales. Ces signes diminuaient, à mesure que les doses étaient réduites. À la dose de 750 µg/kg pc, une souris ayant survécu pendant 9 heures a présenté une hémorragie intense dans la cavité abdominale. Suite à ces observations, les auteurs proposent un NOAEL de 15 µg/kg pc, très éloignée de la valeur proposée par Sosa *et al*., en 2009 (300 µg/kg pc). Dans la présente étude, les souris exposées à 15 µg/kg pc de PLTX n'ont montré ni signe de douleur, ni d'autres symptômes et sont restées en bonne santé pendant la période d'observation totale (96 heures). Contrairement à ce qui a été observé dans l'étude de Sosa *et al*. de 2009, les souris n'avaient pas de symptôme de démangeaison (comportement de grattage), ni de saut. L'une des différences entre les deux études est un accès libre à la nourriture et à l'eau pendant le traitement (Boente-Juncal *et al*., 2020a), alors que dans l'étude précédente, les animaux ont été privés de nourriture pendant 16 heures avant et 2 heures après le traitement (Sosa *et al*.,

2009). Des analyses biochimiques sanguines ont également été réalisées sur des souris exposées à la toxine, et comparées à des souris contrôles. La PLTX n'a pas modifié la glycémie, ou la cholestérolémie. Cependant, les concentrations plasmatiques d'ALAT, d'ASAT, de la CPK et de la LDH ont augmenté de manière significative après une administration de PLTX à des doses de 36 µg/kg pc et plus. Les faibles doses de PLTX n'ont pas provoqué de changements significatifs de la natrémie ou de la chlorémie, seule une augmentation significative a été observée à la dose de 300 µg/kg pc (pour Na^+ et Cl^-), alors qu'à 1200 µg/kg pc, seule une diminution de la natrémie était observée. Enfin, une augmentation de la kaliémie a été observée aux fortes doses (750 et 1200 µg/kg pc). L'analyse ultra-structurale du foie et des reins a été réalisée sur des souris témoins et traitées avec 500 et 750 µg/kg pc de PLTX. Des lésions hépatiques sont visibles après 96 heures chez les souris traitées. Au niveau des organites intracellulaires, à 500 µg/kg pc de PLTX, quelques noyaux d'hépatocytes étaient lésés, mais les mitochondries et le réticulum endoplasmique étaient normaux. À 750 µg/kg pc de PLTX, une diminution du glycogène a également été observée, ainsi qu'une désorganisation des mitochondries et un détachement des ribosomes du réticulum endoplasmique avec dégranulation. À cette dose, plusieurs autophagosomes contenant des débris cellulaires étaient présents dans les hépatocytes. Les effets de la PLTX se manifestaient également au niveau des reins. A 750 µg/kg pc (mais pas à 500 µg/kg pc), la PLTX a provoqué des altérations de la structure du néphron : les noyaux des podocytes étaient irréguliers et les podocytes individuels fusionnés. Ces effets sur les reins peuvent être reliés aux effets observables chez l'Homme après intoxication par la PLTX (Wu *et al*., 2014).

Sur la base de ces observations, les auteurs concluent que le NOAEL est dix fois inférieur à celui préalablement identifié dans l'étude de Sosa *et al*. de 2009. Les auteurs retiennent la dose de 15 µg/kg pc comme étant un NOAEL dans cette étude, sur la base des symptômes observés (dyspnée, douleurs abdominales) à partir de la dose de 36 µg/kg, sans plus de précisons (Boente-Juncal *et al*., 2020a).

Sosa *et al*. ont exposé par gavage des souris femelles (souche CD-1, n = 8, 18-20 g, âgées de 4 semaines) à des doses uniques de PLTX (Wako chemical GmbH, pureté >90%) de 0, 30, 90 et 270 µg/kg pc et ont réalisé un suivi pendant 24 heures (Sosa *et al*., 2022). La PLTX a également été testée en présence d'acide okadaïque (OA) (phycotoxine lipophile produite par *Dynophysis spp* et *Prorocentrum spp*)) pour évaluer un potentiel effet synergique de ces substances en mélange. Concernant la PLTX, la mortalité observée était de 0/16 pour les animaux contrôles, de 0/8 à 30 µg/kg pc, de 2/8 à 90 µg/kg pc et de 2/8 à 270 µg/kg pc. Après 24 heures de suivi, aucun signe de toxicité n'a été observé à la dose de 30 µg/kg pc. A la dose de 90 µg/kg pc, les observations cliniques étaient des démangeaisons (comportement de grattage) (1/8), une pilo-érection (2/8), des spasmes musculaires (2/8) et une dilatation abdominale (1/8). A la dose de 270 µg/kg pc, les auteurs ont observé des démangeaisons (comportement de grattage) (1/8), une pilo-érection (2/8), une sédation (2/8), des tremblements (2/8), une agitation (2/8), une paralysie (3/8), une dyspnée (2/8), des spasmes musculaires (2/8), une dilatation abdominale (1/8). Le poids corporel moyen des animaux était diminué (environ de 5%) après 24 heures d'observation pour les doses de 90 et 270 µg/kg pc (mais pas à 30 µg/kg pc). Après administration, la prise alimentaire était également diminuée, 24 heures après l'administration (environ 17%) pour les doses de 90 et 270 µg/kg pc. Une explication pourrait être que la PLTX aurait un goût qui influe sur la prise alimentaire chez le rongeur. Sur la base de ces observations, les auteurs ne se prononcent pas sur une dose seuil sans effet pour la PLTX seule, mais retiennent un LOAEL pour le mélange (30 µg/kg pc de PLTX + 370 µg/kg pc d'OA).

- **Voie respiratoire (inhalée, intratrachéale, instillation intranasale)**

Une étude de toxicité aiguë a été réalisée sur des rats mâles Wistar (n = 21) exposés à la PLTX (solution aqueuse avec 50% éthanol) par voie intratrachéale (Wiles *et al*., 1974). Les DL_{50} respectives à 5 et 10 jours ont été estimées à 0,31 µg/kg pc ($IC_{95\%}$ = 0,17-0,54 µg/kg pc) et 0,18 µg/kg pc ($IC_{95\%}$ = 0,09-0,38 µg/kg pc). La DL_{50} de la PLTX administrée par voie intratrachéale à des rats Wistar mâles pendant 24 heures a été évaluée à 0,36 µg/kg pc ($IC_{95\%}$ = 0,23-0,55 µg/kg pc).

Les signes de toxicité rapportés étaient similaires à ceux observés après une injection IV mais avec des difficultés respiratoires plus importantes et une respiration sifflante (Wiles *et al*., 1974).

Dans l'étude de Poli *et al*., des rats Fischer femelles ont été exposées par inhalation à de la PLTX (dose unique, nez seulement, 15 à 20 minutes d'exposition, moyenne des diamètres aérodynamiques médians de masse = 1,04 ± 0,01 µm et avec au moins 99,98% des particules comptées qui avaient un diamètre de moins de 3,52 µm) (Poli *et al*., 2018). La DL_{50} de la PLTX était de 0,041 µg/kg pc. Des lésions ont été observées sur un grand nombre de tissus. Douze heures après l'exposition à la PLTX, tous les rats montraient des lésions histologiques au niveau pulmonaire : nécrose de l'épithélium des grandes voies respiratoires, exsudation de fibrine dans la lumière alvéolaire des zones autour des bronches secondaires et bronchioles, augmentation des macrophages alvéolaires, inflammation neutrophilique et œdème. Ces lésions étaient modérées à sévères et affectaient 50 à 75% de l'aire pulmonaire. De plus, l'épithélium nasal présentait une dégénérescence et une nécrose légère à modérée avec une infiltration de neutrophiles. De manière similaire, nécrose, dégénérescence et/ou perte de l'épithélium ont été observées au niveau de la trachée, tandis qu'au niveau du foie, une congestion marquée de la zone centro-lobulaire était rapportée sans changement significatif au niveau des hépatocytes. Plusieurs tissus lymphoïdes (thymus, rate, ganglions lymphatiques mésentériques et/ou mandibulaires) étaient également touchés (nécrose, apoptose légère à modérée des lymphocytes et/ou déplétion). Au niveau cardiaque, les cardiomyocytes du ventricule droit et/ou du muscle papillaire droit subissaient une dégénérescence légère et une nécrose aiguë avec augmentation de l'éosinophilie du cytoplasme et pycnose nucléaire (avec ou sans précipitation minérale). De plus, chez quelques rats, des altérations de type dégénérescence/nécrose ont été observées sur l'épithélium rénal tubulaire et l'épithélium du conduit de la glande salivaire mandibulaire. Vingt-quatre heures après exposition, tous les rats présentaient des lésions au niveau de l'ensemble de ces tissus et organes. Les lésions étaient semblables à celles observées à 12 heures mais avec un degré de sévérité plus élevé. Dans les poumons, l'exsudation de fibrine était plus étendue, les septas alvéolaires étaient souvent nécrotiques, avec une hémorragie locale et une inflammation plus intense, impliquant plus de neutrophiles dont certains en dégénérescence dans les zones à nécrose. Dans le cœur, des infiltrations d'histiocytes (macrophages du tissu conjonctif), de lymphocytes et de quelques neutrophiles ont été observées dans les zones nécrotiques. Le foie présentait une nécrose coagulante des hépatocytes et une congestion marquée à sévère dans la zone centro-lobulaire. De même, une dégénérescence/nécrose des tubules rénaux, du conduit de la glande salivaire submandibulaire, du thymus et de nodules lymphatiques ont été observées. À 36 heures, les mêmes effets étaient encore observés mais avec un degré de sévérité encore plus élevé.

Les auteurs identifient une DL_{50} pour la voie inhalée de 0,03-0,06 µg/kg, sans proposer de NOAEL sur la base des effets observés.

La DL_{50} à 24 heures de la PLTX administrée par voie intratrachéale à des rats Wistar mâles est de 0,36 µg/kg pc (Wiles *et al*., 1974) ce qui serait environ 10 fois plus élevé que par inhalation (Poli *et al*., 2018). Cependant, dans cette première étude, il convient de noter que la PLTX était semi-purifiée et préparée dans un mélange eau/éthanol. Au cours des 10 jours d'observation suivant l'administration, les rats exposés continuaient de mourir. Les DL_{50} respectives à 5 et 10 jours sont estimées à 0,31 µg/kg pc et 0,18 µg/kg pc (Wiles *et al*., 1974). Les animaux présentaient également des difficultés respiratoires et une respiration sifflante.

L'instillation intratrachéale de PLTX chez la souris a provoqué une hémorragie alvéolaire, un œdème pulmonaire, une érosion gastro-intestinale et une atrophie glomérulaire (Ito et Yasumoto, 2009). La mort a résulté de symptômes paralytique, pour une dose de 2 µg/kg pc chez la souris et de 5 à 7,5 µg/kg pc chez le rat (mais le temps d'observation n'est pas indiqué). À une dose sublétale (1 µg/kg), les rongeurs étaient paralysés et ne pouvaient plus se mouvoir pendant 1 à 2 heures, avant de se rétablir. Après 24 heures, les animaux présentaient un comportement normal, mais l'analyse histologique a révélé de multiples lésions tissulaires (poumons, gastro-intestins et reins).

Pour l'étude par instillation intranasale, les rats (femelles) ont reçu une dose d'aérosol de 0,05 µg/kg pc de PLTX (Poli *et al*., 2018). Après euthanasie, des lésions au niveau des poumons et du foie sont été observées. Dans les poumons, on observait des foyers congestifs des congestions pulmonaires, des consolidations des lobes et/ou des zones d'hémorragie. Dans le foie, des lésions hépatocytaires, des zones d'hémorragie, et une congestion hépatique ont été observées. Certains rats présentaient une épistaxis (hémorragie nasale) et/ou des croûtes rouges autour des paupières et des narines (Poli *et al*., 2018).

- **Voie cutanée**

L'une des rares études expérimentales de la toxicité dermique de la PLTX est assez ancienne (Wiles *et al*., 1974). Deux voies d'exposition sont explorées : percutanée et intradermique. Seule la voie percutanée est présentée ici, la voie intradermique ne présentant que peu d'intérêt.

Pour la voie percutanée, la PLTX en solution aqueuse (5 µg/mL) a été appliquée sur le dos d'un lapin. Des volumes totaux de 0,1 et 0,05 mL ont été appliqués sur deux zones distinctes afin d'évaluer les effets toxiques ou irritants de la PLTX (Wiles *et al*., 1974). L'application de 0,05 ou 0,1 mL de PLTX (5 µg/mL) sur la peau d'un lapin a induit au bout de 1 à 2 heures l'apparition d'une zone blanchie et légèrement œdématiée au site d'application. Après 4 à 5 heures, les auteurs ont constaté un œdème et une nécrose de la zone blanchie et de la zone enflammée périphérique. Bien que l'étude ne soit que sur un seul animal, ce résultat suggère que la PLTX agit en induisant des effets nécrosants et inflammatoires au niveau de la peau. Une étude plus récente a testé différentes doses de PLTX[4] en application topique sur des oreilles de souris (Fujiki *et al*., 1986). L'effet irritant de la PLTX, mesuré comme étant la quantité de toxine induisant un érythème des oreilles de 50 % des souris testées 24 heures après le test, était de 0,02 µg/oreille. Les souris mouraient en 4 heures, après l'application sur l'oreille de 33 ou 165 µg de PLTX.

[4] 2 PLTX extraite de *P. tuberculosa* sans mention de pureté. Les quantités de PLTX étaient de 0,3, 3,3, 8,25, 33 et 165 µg.

- **Voie intraveineuse (IV)**

La PLTX est extrêmement toxique après injection IV chez les mammifères (rat, lapin, chien, singe Rhésus, cobaye, souris) avec des DL_{50} oscillant entre 0,025 et 0,45 µg/kg. Les animaux meurent en quelques minutes suite à une augmentation de la pression artérielle consécutive à une vasoconstriction sévère et une défaillance cardiaque (Ito *et al*., 1982 ; Deeds et Schwartz, 2010). Ainsi, la mort rapide des animaux après injection IV de PLTX est probablement due aux spasmes intenses des muscles lisses vasculaires coronariens (infarctus) résultant en une diminution marquée du flux sanguin au cœur. Une diminution plus importante du flux sanguin et de l'approvisionnement en oxygène, provoquant une ischémie et à terme l'anoxie des principaux organes, semble être également impliquée dans des morts survenant plus tardivement (Vick et Wiles, 1975). Des chiens anesthésiés et des chats ayant reçu une dose létale de PLTX par voie IV (0,03 µg/kg, 0,2 µg/kg respectivement) ont présenté des altérations du rythme cardiaque, notamment une bradycardie et des arythmies cardiaques (Vick et Wiles, 1975 ; Deguchi *et al*., 1976 ; Ito *et al*., 1982). Le flux sanguin dans les artères coronaires cesse ce qui induit une ischémie myocardique et un arrêt cardiaque. Bien qu'un effet dépresseur respiratoire soit observé, la mort est bien consécutive à un effet/arrêt cardiaque car la respiration artificielle ne modifie pas la dose minimale létale de PLTX chez le chien (Ito *et al*., 1982). Un effet électrophysiologique direct sur les cardiomyocytes altérant les propriétés contractiles a également été montré (Kockskämper *et al*., 2008).

- **Voie intra-péritonéale (IP)**

La toxicité par voie IP est significativement inférieure à celle observée par voie IV ou par inhalation. À des doses létales (4 à 5 fois la DL_{50}), la mort survient après environ 1 h (Riobó *et al*., 2008). À des doses légèrement supérieures à la DL_{50}, les animaux meurent après 3 à 5 heures (Ito *et al*., 1996). À des doses proches de la DL_{50}, les souris meurent après 12 à 40 heures (Riobó *et al.*, 2008 ; Munday *et al*., 2011). Les symptômes observés après exposition à une dose létale de PLTX par voie IP sont l'ataxie et une pilo-érection, qui surviennent assez rapidement. Il est également noté un étirement des membres postérieurs, des spasmes musculaires, une dyspnée et une détresse respiratoire, ainsi qu'une paralysie musculaire progressive (Ito *et al*., 1996 ; Rhodes *et al*., 2002 ; Riobó *et al*., 2008). Après 30 à 60 minutes, en fonction de la dose, les membres postérieurs des animaux sont allongés et paralysés. La fréquence respiratoire diminue, avec des halètements occasionnels, et la paralysie s'étend à l'ensemble du corps. Les souris ne répondent alors plus aux stimulations tactiles. Une détresse respiratoire, qui s'accompagne d'une exophtalmie et d'une cyanose, précède la mort (Moore et Scheuer, 1971 ; Rhodes *et al*., 2002 ; Riobó *et al*., 2008 ; Sosa *et al*., 2009). L'examen histologique post-mortem montre des adhérences au niveau du péritoine, avec ascite et dilatation de l'intestin grêle, qui présente des saignements et des œdèmes (Ito *et al*., 1996). Ces mêmes effets sont également observés dans le cœur et au niveau des lymphocytes du thymus et de la rate (Terao *et al*., 1992). En microscopie électronique, on observe un gonflement des mitochondries et une séparation des organites intracellulaires dans les myocytes, ainsi qu'une déplétion des microvillosités dans les tubules rénaux et une vacuolisation des cellules acineuses pancréatiques (Ito *et al*., 1996, 2009 ; Terao *et al*., 1992 ; Del Favero *et al*., 2013 ; Pelin *et al*., 2014). Après 3 heures, tous les organes montrent une congestion marquée. Histologiquement, le cœur est l'organe le plus touché avec de nombreuses altérations cellulaires du myocarde (œdème, nécrose) au niveau des 2 ventricules et du septum. Au niveau ultra-structural, les mitochondries sont arrondies, la matrice mitochondriale est plus dense mais l'organisation des crêtes reste normale. La plupart des organelles (dont les myofibrilles et le réticulum sarcoplasmique) apparaissent séparées

les unes des autres. Les cellules endothéliales des capillaires de l'interstitium sont également gonflées. Ces modifications sont observées jusqu'à 24 heures après exposition. Des altérations au niveau rénal sont également observées avec beaucoup de vacuoles autophagiques et de lysosomes en dessous de la bordure arrière en brosse des tubes contournés proximaux et, parfois, une destruction des microvillosités. De nombreuses gouttelettes lipidiques et l'accumulation de matériel dense dans le réticulum endoplasmique lisse sont souvent observées. Les tubes contournés distaux sont également altérés avec perte de microvillosités et gonflement cytoplasmique. En revanche, il n'y a pas de changement observé au niveau des glomérules. Au niveau hépatique, les hépatocytes de la zone centrale présentent des vacuoles aqueuses et une accumulation de gouttelettes lipidiques. Dans les acini pancréatiques, de nombreuses vacuoles autophagiques sont observées dans la région du réticulum endoplasmique rugueux. Au niveau de l'intestin grêle, des vacuoles dans les cellules intestinales sont formées. La PLTX (1 µg/kg pc) administrée à des souris induit des lésions intestinales : en moins d'une heure, les villosités de l'intestin grêle sont hémorragiques. Après 6 heures, la congestion des villosités et l'œdème de la lamina propria sont significativement développés. Après 16 heures, les animaux sont atteints de diarrhée, qui s'accompagne d'une péritonite aiguë. Après 24 heures, les villosités perdent leurs cellules épithéliales, et se rabougrissent. L'hypersécrétion de mucus du côlon est très probablement stimulée physiquement par la péritonite, qui favorise la diarrhée (Ito *et al*., 1996). Sur le plan biochimique, des taux plasmatiques élevés de CPK sont observés chez des souris après exposition IP à une dose sublétale de PLTX (Taniyama *et al*., 2003). La DL_{50} à 24 heures sur des rats est de 0,63 µg/kg pc. Elle est très proche de celle déterminée sur des souris de 0,72 µg/kg pc (Rhodes *et al.,* 2002). Les signes toxiques et la rapidité d'apparition sont similaires à ceux observés pour les voies intramusculaire et sous-cutanée (Wiles *et al*.,1974). Plus récemment, la DL_{50} a été estimée à 1,81 µg/kg pc sur des rats Fischer femelles (Poli *et al*., 2018). Sur les 31 rats, 15 n'ont pas survécu jusqu'à la fin de l'étude (7 jours). Aucun rat euthanasié immédiatement après le traitement n'a montré de lésion histologique. En revanche, des altérations histologiques ont été relevées sur certains rats décédés vers la fin de l'étude et/ou ayant survécu :

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

3.2.2 Irritations cutanée et oculaire

3.2.2.1 Données chez l'Homme

Des symptômes dermatologiques, notamment des dermatites, ont été associés à l'exposition cutanée à la PLTX pendant des efflorescences d'*Ostreopsis* (Pelin *et al*., 2011), ce qui nécessite de disposer de données expérimentales *in vivo* pour pouvoir caractériser les effets de la PLTX sur la peau.

3.2.2.2 Données chez l'animal

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

- après 4 heures, les auteurs ont constaté l'apparition d'un larmoiement modéré, d'irritation, d'œdème et de conjonctivite ;
- à 24 heures, les yeux affectés étaient complètement fermés, avec un exsudat de pus et de sang, ainsi qu'une conjonctivite sévère avec œdème, ulcération cornéenne et opacité. Ces symptômes ont persisté à différents degrés pendant 7 jours. Les effets toxiques apparaissaient plus tôt si la concentration de PLTX était plus élevée mais, après 24 heures, les effets étaient similaires quelle que soit la concentration utilisée. Les plus fortes concentrations de PLTX ont provoqué des séquelles irréversibles. Avec les doses plus faibles, la récupération était plus rapide et complète. Les lésions oculaires observées à 0,4 µg/kg pc étaient irréversibles, avec la présence d'une cornée ulcérée, des adhésions entre l'iris et la cornée (synéchie antérieure) et un glaucome secondaire.

Dans la même étude, lorsqu'une application de 5 µg/kg pc de PLTX était réalisée et suivie d'un rinçage avec une solution isotonique saline à 1, 5 ou 15 minutes, tous les animaux montraient des lésions conjonctivales et cornéennes modérées à sévères en 24 heures. Les effets irritants apparaissaient environ 2 heures après l'instillation, chez tous les animaux, indépendamment du temps d'exposition à la PLTX. En revanche, un certain degré de récupération était observé en 48 heures chez quelques animaux : les yeux étaient ouverts et la production de pus diminuait, cependant un œdème faible à modéré persistait, ainsi que des signes d'irritation et une opacité cornéenne même après un rinçage de 5 et 15 minutes (Wiles *et al*., 1974).

3.2.3 Sensibilisation

3.2.3.1 Données chez l'Homme

Aucune étude n'a été identifiée dans la littérature.

3.2.3.2 Données chez l'animal

Aucune étude n'a été identifiée dans la littérature.

3.3 Toxicité répétée et chronique

L'exposition humaine à la PLTX est susceptible de se produire par la consommation de denrées alimentaires contaminées, notamment pour des populations vivant dans des zones littorales. Une exposition répétée pendant une période limitée est alors probable. Différentes études expérimentales se sont penchées sur la toxicité de la PLTX par voie orale après des administrations répétées. Nous ne reviendrons pas, dans cette partie, sur les données de l'étude d'Ito et Yasumoto de 2009, qui ont réalisé des administrations sublinguales quotidiennes de PLTX sur deux ou trois jours (cf. §3.2.1.2).

3.3.1 Données chez l'Homme

- **Voie orale**

Aucune étude de toxicité répétée ou chronique de la PLTX pour la voie orale n'est disponible.

- **Voie respiratoire**

Aucune étude de toxicité répétée ou chronique de la PLTX pour la voie inhalée (inhalation ou instillation intratrachéale) n'est disponible. Seules des études de cas rapportés d'inhalation d'aérosols sur des durées variables avec des conséquences variables sur la fonction respiratoire ont été identifiées.

- **Voie cutanée**

Aucune étude de toxicité répétée ou chronique de la PLTX pour la voie cutanée n'est disponible.

3.3.2 Données chez l'animal

- **Voie orale**

Dans l'étude de Del Favero *et al*., la PLTX[5] a été administrée par gavage à des doses de 0, 30 (faible), 90 (intermédiaire) et 180 (forte) µg/kg pc/j pendant 7 jours consécutifs à des groupes de 6 souris femelles CD1 (18-20 g, âgées de 4 semaines), suivi d'une phase de récupération (sans intervention) de 2 semaines (Del Favero *et al*., 2013). Au cours du traitement, une mortalité respective de 13, 33 et 83% a été rapportée. Au cours de la phase de récupération, une souris du groupe avec la plus faible dose et deux du groupe avec la dose intermédiaire sont décédées. Par ailleurs, le poids des souris a diminué dans tous les groupes traités jusqu'à 40%. Cette perte de poids était associée à la diminution de la consommation de nourriture dès le 2ème jour. Juste avant la mort, les souris montraient les symptômes suivants : une perte de coordination motrice, une hypo-réactivité, une sédation générale avec une perte de réflexes et, dans certains cas, une paralysie des membres inférieurs. La mort était précédée de difficultés respiratoires et de halètements. Indépendamment des effets létaux, l'abdomen était gonflé dès le 3ème jour de traitement affectant plus de souris avec la faible dose (4/6) qu'avec la dose intermédiaire (3/6) et la dose forte (1/6). Chez les souris ayant un abdomen gonflé, une accumulation de liquide et de gaz dans le tractus intestinal était observée, avec des fèces moins importantes que chez les souris témoins. La présence de chromodiacryorrhée (écoulement de larmes rouges au niveau des yeux ou des narines en raison de la présence de protoporphyrine[6]) était également visible chez quelques souris à 30

[5] PLTX extraite de *P. tuberculosa* (Wako, pure à plus de 90%) et administrée dans du PBS.
[6] Composant de la partie héminique de l'hémoglobine.

et 90 µg/kg pc/j, dès le 3ème/4ème jour. À la différence du foie, des poumons et du cerveau, une augmentation du poids relatif des reins, de la rate et du cœur était observée uniquement à la plus forte dose (180 µg/kg pc/j). Au niveau pulmonaire, des altérations histologiques (œdème alvéolaire faible à sévère associé parfois à une inflammation aiguë et à de la nécrose) ont été observées chez 2 des 6 souris mortes prématurément, et ce quelle que soit la dose. Des altérations cardiaques (séparation des fibres musculaires), pour les doses de 90 et 180 µg/kg pc/j et dans une moindre mesure à 30 µg/kg pc/j, ont également été notées. De même, des effets sur le foie avec une diminution marquée (souris mortes pendant le traitement) ou légère (pour les souris sacrifiées à la fin du traitement) du contenu en glycogène a été observée. Des plages de nécrose étaient également visibles chez une souris morte (dose forte). Il y avait peu d'effets au niveau de l'estomac alors que, dans la rate, si aucun effet n'a été relevé à 180 µg/kg pc/j, les souris mortes pendant le traitement à 30 et 90 µg/kg pc/j avaient une déplétion modérée des éléments lymphoïdes des follicules lymphatiques.

Dans la seconde expérience, réalisée pour déterminer un NOAEL, des groupes de 8 souris ont été exposés à 0, 3 ou 30 µg/kg pc/j pendant 7 jours consécutifs (Del Favero *et al*., 2013). Comme précédemment, 4 souris par groupe ont été euthanasiées, 24 heures après le dernier gavage. Les animaux restants ont été surveillés pendant 2 autres semaines pour évaluer la réversibilité de l'intoxication. Aucune mortalité n'a été observée au cours de cette seconde expérience. Aucune altération, ni signe clinique n'ont été observés pour le groupe traité à 3 µg/kg pc/j alors que les souris traitées avec 30 µg/kg pc/j montraient des petits signes d'hypoactivité transitoires et des épisodes de comportement de grattage sporadiques. De plus, deux souris ont présenté une dilatation de l'abdomen. Aucun changement de poids n'a été observé avec le groupe exposé à 3 µg/kg pc/j, alors qu'une diminution de 25% associée à une diminution de la consommation de nourriture a été observée pour le groupe exposé à 30 µg/kg pc/j. Pendant la période de récupération, les poids et la consommation de nourriture sont revenus à la normale. Aucun effet sur les poids relatifs des différents organes (foie, reins, poumons, rate, cerveau et cœur) n'a été observé. Au niveau plasmatique, pour les 2 groupes, il n'y a pas eu de changement significatif des transaminases, de la CPK, de la LDH, ainsi que de la natrémie, la kaliémie, la calcémie, la chlorémie et la phosphatémie (phosphate inorganique). Par contre, une forte tendance à l'augmentation des niveaux en ALAT, ASAT et LDH a été observée à 30 µg/kg pc/j et de la CPK à 3 et 30 µg/kg pc/j. À la fin de la période de récupération, les niveaux étaient revenus à la normale sauf pour les ASAT et ALAT qui restaient plus élevées (mais cette élévation n'était pas statistiquement significative) pour le groupe traité à 30 µg/kg pc/j.

L'analyse histologique post-mortem n'a pas montré d'altération au niveau des poumons, ni du cœur. Comme avec les plus fortes doses, mais à un degré moindre, des altérations au niveau du foie ont été observées dans le groupe traité à 30 µg/kg pc/j. Aucune altération n'a été détectée au niveau de la rate.

Cette étude montre donc que l'administration orale quotidienne de PLTX pendant 7 jours peut être létale à partir de 30 µg/kg pc/j, dose 17 fois inférieure à la DL_{50} après administration unique. Le fait que la mortalité puisse être observée plusieurs jours après l'exposition indique que les effets toxiques induits par la répétition de l'exposition ne sont pas entièrement réversibles et peuvent s'avérer fatals. Les auteurs proposent un NOAEL de 3 µg/kg pc/j et un LOAEL de 30 µg/kg pc/j. A ce LOAEL, les viscères (poumons, cœur, foie, tractus gastro-intestinal) sont des cibles importantes de la PLTX.

Dans cette étude l'effet apparaissant à la plus faible dose est la perte de poids chez l'animal. Au vu des données de la littérature, la perte de poids ne semble pas être l'effet le plus documenté, ni celui qui apparaît à la dose la plus faible. De plus, la variation pondérale des

animaux traités à la PLTX est associée à une diminution de la prise alimentaire dont la cause reste à identifier. Compte tenu de ces observations, le NOAEL dans cette étude pourrait être sous-estimé.

Dans l'étude de Boente-Juncal *et al*., la toxicité répétée de la PLTX extraite de *P. tuberculosa* (Wako, pure à 88,9%) a été évaluée chez des souris femelles Swiss (21- 25 g, n = 3-10/groupe ; âgées de 4 semaines au début de l'expérience) exposées par gavage pendant une période de 28 jours à des doses de 0,03 ; 0,1 ; 0,3 ; 1, 3,5 et 10 µg/kg pc/j (Boente-Juncal *et al*., 2020b). Une DL_{50} de 0,44 µg/kg pc a été calculée. À 10 µg/kg pc/j, aucune souris n'a survécu après 18 jours de traitement, alors qu'à 3,5 µg/kg pc/j et 0,3 µg/kg pc/j, respectivement 75% et 43 % de mortalité était constaté. Les premiers décès ne sont survenus que tardivement (à partir de 17 jours de traitement pour la dose 0,3 µg/kg pc/j). À 0,03 µg/kg pc/j, aucune mortalité n'a été observée. Les temps de survie différaient considérablement d'un animal à un autre et pour chaque dose de toxine.

A la dose de 0,03 µg/kg pc/j, aucun symptôme évocateur d'une intoxication à la PLTX n'a été observé. A la dose de 0,1 µg/kg pc/j, des symptômes typiques (léthargie, douleurs abdominales, œdème de la face, cyphose, piloérection) étaient observés. Les souris exposées à 1 et 3,5 µg/kg pc/j perdaient du poids. L'apparition des symptômes était dose-dépendante. Certains symptômes n'apparaissaient qu'à des doses plus élevées comme l'ataxie, la dyspnée et les mouvements circulaires (à partir de 1 µg/kg pc/j) ou bien des vocalisations (à partir de 3,5 µg/kg pc/j).

Aucune altération macroscopique n'a été relevée à la dose de 0,03 µg/kg pc/j. En revanche, un gonflement de l'abdomen et la présence de gaz et de mucus au niveau de l'estomac et des intestins étaient fréquemment observés chez certains animaux traités avec les doses supérieures. Au dernier jour de traitement, la quantité cumulée d'urine était moindre pour les souris traitées aux doses de 1 et 3,5 µg/kg pc/j. Aucun effet sur la masse cumulée de fèces n'a été observé.

L'exposition répétée a entraîné des effets significatifs sur les paramètres biochimiques du sang et les paramètres urinaires. Après 28 jours ou juste après la mort de l'animal, les paramètres plasmatiques suivants ont été mesurés : natrémie, kaliémie, chlorémie, ALAT, ASAT, LDH et CPK. Les quatre enzymes (ALAT, ASAT, CK, LDH) avaient des niveaux augmentés à 0,1 et 0,3 µg/kg pc/j. Une augmentation du taux de l'ASAT et ALAT ont également été observée à 1 et 3,5 µg/kg pc/j. Des variations significatives de la natrémie (diminution à la dose de 0,3 µg/kg pc/j) et de la kaliémie (augmentation aux doses de 0,03, 0,1 et 0,3 µg/kg pc/j) que les experts ont estimé rester dans les normales physiologiques pour cette espèce, et consécutivement du rapport Na+ /K+ ont été observées. La chlorémie était également augmentée pour les doses de 0,03 à 1 µg/kg pc/j. Ces perturbations des concentrations ioniques plasmatiques sont en accord avec les altérations précédemment rapportées produites par une dose orale unique de PLTX. Parmi les différents paramètres urinaires mesurés, seule une augmentation du taux de bilirubine a été observée à 0,1 et 3 µg/kg pc/j.

De plus, des altérations macroscopiques au niveau du tractus digestif et des altérations ultrastructurales de l'estomac ont été observées. Chez les souris traitées à la dose de 1 µg/kg pc/j pendant 9 jours ou de 3,5 µg/kg pc/j pendant 22 jours, la surface des cellules muqueuses de l'estomac était altérée et leur noyau présentait un aspect irrégulier. Aux doses de 1 et 3,5 µg/kg pc/j, des altérations ultrastructurales des cellules de l'épithélium gastrique étaient visibles (détérioration du cytoplasme, mitochondries « denses » et présence anormale d'autophagosomes). Un rétrécissement de la membrane nucléaire était également constaté, avec la présence de débris de la membrane nucléaire. Ces altérations suggèrent une apoptose

des cellules pariétales. Les données de cet article montrent que pendant la période d'exposition de 28 jours, les souris ayant reçu une dose quotidienne de 0,03 µg/kg pc/j de PLTX n'ont pas présenté de modifications notables. Les auteurs proposent un NOAEL de 0,03 µg/kg pc/ sur la base des effets observés à la dose de 0,1 µg/kg (LOAEL).

- **Voie respiratoire**

Aucune étude n'a été identifiée dans la littérature.

- **Voie cutanée**

Aucune étude *in vivo* sur les mammifères ou chez l'Homme n'est disponible quant à d'éventuels effets toxiques de la PLTX par voie cutanée.

- **Voie intra-péritonéale**

Les effets d'une exposition à une dose sublétale de PLTX (0,25 µg/kg pc) 5 fois/semaine pendant un mois ont été évalués sur les organes lymphoïdes (thymus, rate et sang) de souris (Ito *et al.,* 1997). Au moment du traitement, 9 souris sur 15 présentaient une diarrhée. Au niveau du thymus, le poids a diminué et des débris de lymphocytes ont été observés dans le cortex. Le poids de la rate était augmenté, en raison d'une exsudation fibrineuse sur la séreuse et la présence de cellules de l'inflammation (monocytes et granulocytes) observées à la surface et dans la pulpe rouge. De même, le nombre des mégacaryocytes sous la capsule et dans la pulpe rouge était augmenté. Des lymphocytes avec un noyau condensé ont été observés dans la pulpe rouge. Le nombre de lymphocytes dans la pulpe blanche était diminué, sauf dans la zone proche de l'artère centrale. Au niveau sanguin, le ratio lymphocytes/ leucocytes totaux a diminué après la 15ème injection et de manière drastique après la 29ème. De plus, une diminution des lymphocytes T et B et une augmentation des monocytes et granulocytes ont été observées après la 29ème injection. Après un mois de récupération, il persistait quelques effets : la densité des lymphocytes dans la médulla du thymus restait plus faible que chez les contrôles, des couches de matière fibreuse entouraient toute la surface de la rate sans signe d'inflammation.

3.4 Effets sur la reproduction et le développement

Aucune étude *in vivo* sur les mammifères ou chez l'Homme n'est disponible quant aux effets de la PLTX sur la reproduction.

3.5 Génotoxicité

Aucune étude *in vivo* ou *in vitro* n'est disponible sur la génotoxicité de la PLTX.

3.6 Cancérogénicité

Aucune étude chez l'Homme n'est disponible quant à la cancérogénicité de la PLTX.

À la suite de l'administration répétée sur la peau de souris (0,5 µg, 2 fois par semaine pendant 30 semaines), la PLTX n'a induit aucune tumeur mais a produit des effets toxiques : 8 souris seulement sur 15 survivaient à la semaine 30. En revanche, si le même schéma d'application était réalisé après une étape d'initiation avec 100 µg de diméthylbenzoanthracène (DMBA), 62,5% des souris présentaient des tumeurs (avec une moyenne d'1 tumeur par souris). Les tumeurs générées ont été identifiées histologiquement comme sept papillomes et un carcinome spinocellulaire précoce invasif. La dose totale de PLTX nécessaire pour une incidence de 50% de tumeurs a été estimée à 15 µg (Fujiki *et al.,* 1986). Les auteurs soulignent l'effet promoteur tumoral de la PLTX au niveau cutané (Wattenberg *et al*., 2007).

3.7 Mécanisme d'action

La pompe Na/K-ATPase est une enzyme membranaire ATPase qui permet le transport d'ions potassium et sodium contre leur gradient de concentration et joue un rôle dans la restauration du potentiel de repos de la membrane cellulaire. C'est un échangeur de 3 ions Na+ cytoplasmiques contre 2 ions K+ extracellulaires en hydrolysant une molécule d'ATP (Figure 1Figure 2). Elle est exprimée dans la plupart des cellules excitables des mammifères mais les conséquences des altérations de son activité sont les plus décrits dans les cellules musculaires incluant les cardiomyocytes, ainsi qu'au niveau neuronal. Ses rôles principaux sont de maintenir à l'intérieur de la cellule une faible concentration de sodium et une forte concentration de potassium, créant ainsi une différence de potentiel de part et d'autre de la membrane cytoplasmique. Cela permet de polariser les tissus excitables (neurones, myocytes) : la dépolarisation et la repolarisation correspondent respectivement à une entrée de sodium et une sortie de potassium. La Na+/K+-ATPase rétablit l'équilibre initial (repos). Le gradient éléctrochimique généré est utilisé pour les transports actifs secondaires, le plus souvent couplés à celui du sodium. De par ses rôles, elle est impliquée dans diverses pathologies comme des troubles du rythme cardiaque ou des œdèmes pulmonaires par l'altération de l'épithélium alvéolaire (Vadász *et al*., 2007 ; Clausen *et al*., 2017). La PLTX inhibe le fonctionnement normal de cette pompe, ce qui permet lune diffusion passive des ions Na+ et K+, selon leur gradient de concentration (Takeuchi *et al*., 2009). Les cations monovalents (Na^+, K^+) peuvent ainsi diffuser à travers le canal ionique généré par la PLTX (Scheiner-Bobis *et al*., 2002).

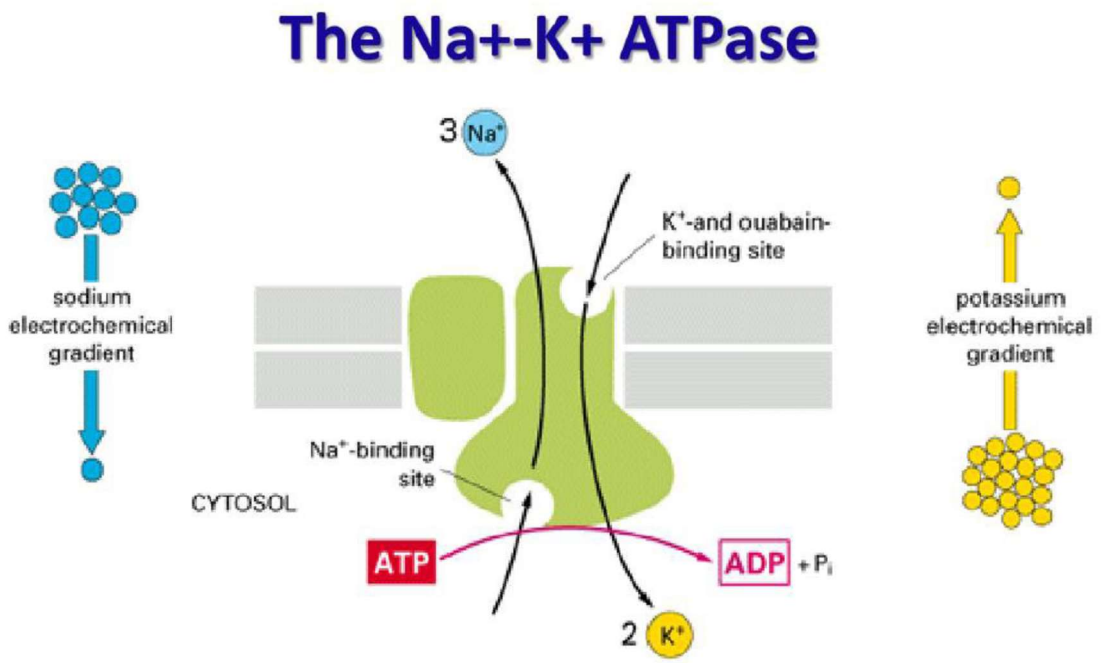


Figure 2: Schéma du fonctionnement de la pompe Na+/K+ ATPase (Alberts *et al*., 2008)

La pompe Na/K-ATPase est un hétéro-complexe protéique composé de deux sous-unités α et β, et d'une sous-unité γ régulatrice. Chaque sous-unité α et β présente différentes isoformes dont le profil d'expression diffère selon les tissus, voire selon le sexe et l'âge. Ainsi, les travaux de Pelin *et al*. montrent que, sur un panel de 60 volontaires sains, la sensibilité à la PLTX de monocytes sanguins isolés est très variable avec une CE_{50} (concentration efficace 50) de $2{,}7.10^{-10}$ M après 4 heures de traitement (Pelin *et al*., 2020). Si aucune différence entre le genre, l'âge et le groupe sanguin n'a pu être mise en évidence, les résultats indiquent, en revanche, une implication de la sous-unité β2 et suggèrent un rôle secondaire de la sous-unité α3 dans la sensibilité des monocytes à la PLTX. Ainsi, une expression plus élevée en sous-unité β2 est corrélée à une plus grande sensibilité des monocytes à la PLTX alors que ce serait l'inverse pour la sous-unité α3 (Pelin *et al*., 2020). Si, à la différence de l'ouabaïne qui se fixe sur la sous-unité α, le site de liaison de la PLTX n'a pas encore été identifié, les résultats de Pelin *et al*. suggèrent plutôt qu'il se situerait sur les sous-unités β. Ainsi, la grande variabilité interindividuelle de réponse aux intoxications alimentaires ou par inhalation avec la PLTX pourraient s'expliquer par l'existence de variants génétiques de la Na/K-ATPase (Pelin *et al*., 2020).

Le traitement de cellules HaCaT (kératinocytes) avec la PLTX provoque une augmentation concentration-dépendante des anions superoxydes mais pas des autres espèces réactives de l'oxygène (peroxynitrite, radical hydroxyle et monoxyde d'azote) (Pelin *et al*., 2013). L'accumulation d'anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) peut être complètement inhibée par un traitement avec un inhibiteur non sélectif de NADPH oxydase (NOX), le chlorure de diphénylèneiodonium, et partiellement en présence de sel d'acétate de méthyl-L-arginine (inhibiteur de l'oxyde nitrique synthase (NOS)). Cependant, Pelin *et al*. ont montré que la cytotoxicité de la PLTX n'est pas contrecarrée en présence de ces inhibiteurs, indiquant que le stress oxydant n'est pas le mécanisme principal de cette toxicité (Pelin *et al*., 2013). En fait, l'augmentation de Na^+ intracellulaire provoquerait une augmentation du différentiel de pH au niveau de la membrane interne des mitochondries, à l'origine de la production d'anions superoxydes, en inversant le transport de la chaîne d'électrons. L'effet de la PLTX peut être empêché par l'addition d'ouabaïne (Schilling *et al*., 2006 ; Wang et Horisberger, 1997). La

PLTX crée un canal cationique en se liant à la Na/K-ATPase qui se présente dans une certaine conformation. Lorsque cette conformation est modifiée, soit par l'addition d'ouabaïne, soit par une concentration élevée en K^+ externe, la liaison de la PLTX ne se fait pas ou est beaucoup plus lente (Wang et Horiberger, 1997). Ainsi, la toxicité de la PLTX est due à l'altération de l'homéostasie ionique normale dans les cellules excitables et non excitables (Wu, 2009 ; Rossini et Bigiani, 2011). Sur les cellules ne dépolarisant pas spontanément, la PLTX dépolarise les cellules en se fixant à la pompe Na/K-ATPase (Kd 20 pM) et en la convertissant en un canal cationique doté d'une sélectivité ionique relativement faible (Wu, 2009). Il en résulte que la Na/K-ATPase, qui transporte activement les ions Na^+ et K^+ contre leurs gradients de concentration, devient un canal cationique non sélectif, dissipant des flux passifs d'ions dans le sens de leurs gradients de concentration respectifs (Rossini et Bigiani, 2011). La PLTX provoque donc un efflux de K^+ et un influx de Na^+ (Habermann, 1989 ; Scheiner-Bobis *et al*., 1994). Le pore de ce canal cationique permet aux molécules de moins de 7,5 Å de passer. Sur des cellules rénales de type HEK-293, la PLTX reste liée pendant de nombreuses minutes à la pompe et le taux de dissociation est donc faible. La phosphorylation des pompes renforce l'interaction avec la PLTX, sûrement en raison de la diminution de la dissociation (Artigas et Gadsby, 2004). Le déséquilibre ionique provoqué par la PLTX avec l'augmentation intracellulaire du Na^+ induit une activation des échangeurs Na^+/Ca^{2+} et Na^+/H^+ en mode inversé. Ceci peut conduire à une acidification de milieu intracellulaire par l'augmentation en ions H^+ et/ou une accumulation de calcium dans le cytosol. Cette augmentation en Ca^{2+} intracellulaire dans les cellules traitées avec la PLTX ne provient pas des réserves intracellulaires de calcium stockées dans le réticulum endoplasmique/sarcoplasmique) mais du Ca^{2+} extracellulaire (Schilling *et al.,* 2006).

Plusieurs autres études confirment que l'interaction de la PLTX avec la Na/K-ATPase induit une modification de la perméabilité ionique membranaire dans un premier temps, conduisant à une dépolarisation et un influx de Ca^{2+} dans un second temps (Amano *et al*., 1997 ; Schilling *et al*., 2006) puis la lyse cellulaire et ce pour différents types de cellules (Satoh *et al*., 2003 ; Schilling *et al.,* 2006 ; Munday, 2011). De nombreux effets cellulaires de la PLTX sont liés à cette augmentation de Ca^{2+} intracellulaire. La cascade de signalisation cellulaire déclenchée par la PLTX conduit notamment à une altération de l'intégrité des filaments d'actine du cytosquelette et des perturbations morphologiques qui y sont liées. Parallèlement, la PLTX favorise la sécrétion de catécholamines et d'autres neurotransmetteurs, *via* l'influx de Ca^{2+}. *In vitro*, la PLTX (1 nM-1 µM) induit la libération de catécholamines dans des cellules endocrines de mammifères d'une manière concentration dépendante (Tatsumi *et al*., 1984 ; Yoshizumi *et al*., 1991). De faibles concentrations de PLTX (10^{-10} M) appliquées sur des synaptosomes cérébrocorticaux de rat provoquent une dépolarisation résultant d'une augmentation de la perméabilité aux ions Na^+ *via* des canaux Nav insensibles à la tétrodotoxine (TTX). Cette dépolarisation membranaire induit un influx de Ca^{2+} et la libération d'acétylcholine. Des concentrations de PLTX plus élevées (10^{-6} M) provoquent une libération d'acétylcholine sans augmenter directement l'influx de Ca^{2+}, mais en agissant sur la mobilisation de Ca^{2+} des réserves internes (RE) (Satoh et Nakazato, 1991). Les effets pro-inflammatoires de la PLTX observés après une exposition par inhalation et/ou par contact cutané seraient dus à l'augmentation des niveaux d'ARNm codant pour des cytokines pro-inflammatoires dans les macrophages humains (Crinelli *et al*., 2012).

Alors qu'aucun d'effet de la PLTX sur la H/K-ATPase humaine non gastrique n'a été rapporté, probablement en raison de l'absence de 40 acides aminés dans la région N-terminale et qui contiendrait donc le site de liaison de la PLTX et de l'ouabaïne (Guennoun-Lehmann *et al*., 2007), d'autres auteurs montrent que la PLTX peut cibler la H/K-ATPase au niveau du côlon,

la convertissant apparemment en canal (Scheiner-Bobis *et al*., 2002). Cela s'explique par le fait que les deux types de pompes [Na/K-ATPase et H/K-ATPase] présentent une forte homologie (Scheiner-Bobis *et al*., 2002). Des expériences *ex vivo* montrent également une plus grande sensibilité de la partie distale du côlon à la PLTX comparée à la partie proximale, s'expliquant par la plus forte concentration de H/K-ATPase au niveau distal (Scheiner-Bobis *et al*., 2002). Il semblerait que les 2 extrémités de la molécule de PLTX interagissent avec la Na/K-ATPase et que l'utilisation de molécules de PLTX modifiées aux 2 extrémités altère significativement la liaison. La concentration de PLTX induisant 50% d'inhibition de l'enzyme isolée et purifiée des plaques électriques de torpille est de 1000 nM pour la PLTX comparée à 200 nM pour l'ouabaïne (Tosteson *et al*., 1995).

La PLTX ne provoque pas l'activation *in vitro* de la protéine kinase C isolée à partir du cerveau de souris jusqu'à une concentration de 1 µg/mL. La toxine ne se lie pas au récepteur membranaire des esters de phorbol (Fujiki *et al*., 1986).

3.8 Populations sensibles

Les informations disponibles sur les expositions humaines à la PLTX montrent qu'il n'existe pas de variations importantes des symptômes en fonction des classes d'âge ou du sexe des personnes exposées (CAPTV Bordeaux, 2022). Les symptômes observés sont majoritairement de la toux, des douleurs oropharyngées et une rhinite aiguë, quel que soit l'âge des personnes. A noter cependant une forte présomption d'association statistique entre le niveau de gravité des symptômes et l'existence d'au moins un antécédent médical (rhinites allergiques, asthme, allergies, tabagisme) par rapport aux personnes ne présentant pas d'antécédent médical.

L'ensemble de ces éléments suggère que les populations atteintes de pathologies respiratoires (asthme, rhinites allergiques), d'allergie, ou d'antécédent tabagique peuvent présenter une sensibilité exacerbée à l'exposition par voie inhalée à la PLTX.

4 Recueil des valeurs toxicologiques de référence

4.1 VTR court terme

4.1.1 Voie orale

Aucune VTR court terme pour la voie orale n'a été identifiée. En 2009, l'EFSA (European food safety authority) a proposé une ARfD (acute reference dose) de 0,2 µg/kg pc/j pour les toxines marines du même groupe que la PLTX en se basant sur l'étude de Ito et Yasumoto de 2009 qui permet d'identifier un LOAEL de 200 µg/kg pc chez la souris pour la PLTX avec en support l'étude de Sosa *et al.* de 2009 qui montre une absence d'effet (NOAEL) à 300 µg/kg pc chez la souris pour la PLTX.

Tableau 1 : ARfD de l'EFSA (2009)

Organisme (année)	Effet critique Étude clé	PoD	FI	VTR
EFSA (2009)	Accumulation de fluides gastrique et atteintes multiviscérales (estomac, intestins, poumons et reins) Ito et Yasumoto (2009)	LOAEL = 200 µg/kg pc	1000 FI_A = 10 FI_H = 10 $FI_{L/B}$ = 10	ARfD = 0,2 µg/kg pc/j

FI_A : facteur d'incertitude inter-espèces ; FI_H : facteur d'incertitude interindividuel ; $FI_{L/B}$: facteur d'incertitude lié à l'utilisation d'un LOAEL ou d'une BMD

4.1.2 Voie inhalée

Aucune VTR court terme pour la voie inhalée n'a été identifiée.

4.1.3 Voie cutanée

Aucune VTR court terme pour la voie cutanée n'a été identifiée.

4.2 VTR moyen et long terme par voie orale

Aucune VTR moyen ou long terme pour les voies orale, respiratoire et cutanée n'a été identifiée.

5 Proposition de VTR court terme par voie orale

5.1 Choix de l'effet critique

Les symptômes précoces observés suite à une exposition à la PLTX par voie orale chez la souris sont une léthargie, une ataxie, des douleurs abdominales, une dyspnée et une piloérection. Ces symptômes sont cohérents avec les données cliniques issues d'intoxications avec les toxines marines. **Les experts de l'Anses retiennent comme effet critique l'ensemble de ces symptômes qui apparaissent suite à une exposition aiguë à la PLTX. Ces effets observés dans cette étude sont le mieux caractérisés et objectivés (Boente-Juncal *et al*., 2020a).**

5.2 Analyse des VTR court terme existantes

Seul l'EFSA a proposé en 2009 une ARfD de 0,2 µg/kg pc/j pour les toxines marines du même groupe que la PLTX (Tableau 1). **Le CES n'a pas retenu la VTR de l'EFSA considérant que l'étude de Ito et Yasumoto de 2009 présente de nombreux biais méthodologiques (faible nombre d'animaux, une seul dose testée, score ToxRtool de 3), et que d'autres études plus récentes montrent des effets à des doses plus faibles. Le CES propose de construire une VTR court terme.**

5.3 Choix de l'étude clé

Cinq études court terme sont disponibles : Wiles *et al.* de 1974, Sosa *et al.* de 2009, Ito et Yasumoto de 2009, Boente-Juncal *et al*. de 2020a et Sosa *et al*. de 2022. Leur analyse critique et leur score ToxRtool sont indiquées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 2 : Analyse critique des études court terme

Références	Score ToxRtool	Analyse critique
Wiles *et al.,* 1974	3	Nombreuses limites méthodologiques incluant l'absence d'un groupe d'animaux témoins, une solution de PLTX diluée à 50% d'éthanol.
Sosa *et al.,* 2009	1	Étude jugée de bonne qualité. Elle permet d'identifier un NOAEL à 300 et un LOAEL à 424 µg/kg/j. Limites : - le suivi des symptômes n'est réalisé que sur 24 heures alors que les effets de la PLTX peuvent être retardés dans le temps, - les doses testées sont relativement élevées (la dose testée la plus faible était de 300 µg/kg).
Ito et Yasumoto, 2009	3	Limites méthodologiques : faible effectif d'animaux, pureté de la PLTX non spécifiée.
Boente-Juncal *et al*., 2020a	1	Étude jugée de bonne qualité. Elle permet d'identifier un NOAEL de 15 µg/kg pc sur la base des observations cliniques réalisées sur un temps de suivi long (96 heures) et bien documentées chez la souris (dyspnée et douleurs abdominales) à la dose de 36 µg/kg pc.

Sosa *et al.,* 2022	1	Étude jugée de bonne qualité. Elle permet d'identifier un NOEL de 30 µg/kg pc sur la base des effets observés à la dose de 90 µg/kg pc (comportement de grattage, sédation, spasmes musculaires). Limite : le suivi des symptômes n'est réalisé que sur 24 heures alors que les effets de la PLTX pouvant peuvent être retardés dans le temps.

Parmi les études présentant une exposition court terme, trois études présentent une qualité méthodologique équivalente avec un score ToxRtool de 1 : les études de 2009 et 2022 de Sosa et *al*. et l'étude de 2020a de Boente-Juncal *et al*.. L'équipe de Sosa *et al*. a administré une dose unique de PLTX à des animaux par voie orale avec un suivi sur 24 heures après l'exposition (Sosa *et al*., 2009 et 2022), alors que l'équipe de Boente-Juncal *et al*. a administré une dose unique de PLTX à des animaux par voie orale mais avec suivi plus long de 96 heures (Boente-Juncal *et al*., 2020a). Dans l'étude de Sosa *et al*. de 2009, le rapport entre la DL_{50} et le NOEL est de 2,56, alors que ce rapport est de 40 dans l'étude de Boente-Juncal *et al*.. De plus, les données cliniques humaines (CAPTV Bordeaux, 2022) ont montré que les effets pouvaient être retardés dans le temps suite à une exposition à la PLTX. Sur la base de ces éléments, **les experts du CES ont retenu l'étude de Boente-Juncal *et al*. comme étude clé (Boente-Juncal *et al*., 2020a)**.

Les études disponibles dans la littérature ont des approches méthodologiques davantage axées sur la détermination de DL_{50} que sur la dose sans effet toxique (NOAEL) ou le LOAEL. Les experts du CES regrettent que les effets investigués dans ces études ne soient que la léthargie, les douleurs abdominales, les dyspnées, l'ataxie et qu'elles ne couvrent pas des effets pouvant apparaître à des doses plus faibles et potentiellement plus graves comme des effets cardio-vasculaires.

5.4 Choix du point de départ

Les préconisations de méthodologie suggèrent de privilégier la construction d'une Benchmark Dose (BMD) chaque fois que les données disponibles le permettent, de retenir un NOAEL en second choix et un LOAEL en dernière option (Anses, 2017).

Compte tenu du manque de robustesse des données (faible effectif) et de l'incertitude dans l'estimation d'une BMD par modélisation mathématique (Annexe 2), cette approche n'a pas été retenue.

Les experts du CES retiennent le NOAEL décrit dans l'étude de Boente-Juncal *et al*. de 2020a de 15 µg/kg pc comme dose sans effet et comme PoD.

NOAEL = 15 µg/kg pc

5.5 Ajustement allométrique

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

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

Le poids moyen des souris retenu est de 22 g basé sur l'intervalle des poids de souris renseigné dans l'étude (18 – 22g). Celui utilisé pour l'Homme pour le calcul est de 70 kg.

Le PoD ajusté est de :

$NOAEL_{HED}$ = 2 µg/kg pc

5.6 Choix des facteurs d'incertitude

Le calcul de la VTR à partir de Boente-Juncal *et al.* de 2020a a été effectué à l'aide des facteurs d'incertitude suivants (FI) (Anses, 2017) :

- variabilité inter-espèces (FI_A) : 2,5

L'ajustement dosimétrique réalisé a permis de calculer une dose équivalente humaine, à l'aide de l'équation précédente. Pour tenir compte de la variabilité toxicodynamique et d'incertitudes résiduelles, un facteur d'incertitude supplémentaire a été fixé à 2,5 selon les recommandations de l'OMS-IPCS (OMS-IPCS, 2005) et sur la base des pratiques de l'Anses (Anses, 2017).

- variabilité interindividuelle (FI_H) : 10

Aucune donnée scientifique permettant de réduire la valeur par défaut n'étant disponible, la valeur de 10 est utilisée.

- utilisation d'un point de départ ($FI_{B/L}$) : 1
- insuffisance des données (FI_D) : 1

Un facteur d'incertitude global de 25 est donc utilisé pour la construction de la VTR.

5.7 Proposition de VTR court terme par voie orale

VTR = 0,08 µg/kg pc/j

S'agissant d'une VTR pour une exposition unique par voie orale, la valeur est à considérer comme une VTR aiguë.

5.8 Niveau de confiance

Un niveau de confiance global **moyen-faible** a été attribué à cette VTR en se basant sur les critères suivants :

- niveau de confiance dans la nature et la qualité dans le corpus de données : moyen (plusieurs études disponibles par voie orale chez la souris, nombre d'animaux limités) ;
- niveau de confiance dans le choix de l'effet critique et le mode d'action : moyen (les symptômes sont très similaires selon les études par voie orale, l'objectivation clinique des effets n'est cependant pas détaillée) ;

- niveau de confiance de l'étude clé : faible (étude en adéquation avec une exposition aigues, études convergentes mais doses testées différentes) ;
- niveau de confiance dans le choix de la dose critique : faible (effets convergents et mode d'action transposable à l'Homme).

6 Proposition de VTR court terme par voie inhalée

Deux études de toxicité aiguë par voie respiratoire sont disponibles : Wiles *et al.* de 1974 et Poli *et al*. de 2018. L'étude de Wiles *et al*. de 1974 étant de qualité limitée sur le plan méthodologique (voie d'exposition inadéquate : intratrachéale et solution de PLTX diluée à 50% d'éthanol), les experts du CES n'ont pas retenu cette étude comme étude clé. Bien que l'étude de Poli *et al.* de 2018 soit la seule disponible pour cette voie, les experts du CES considèrent qu'elle ne peut être retenue comme étude clé du fait de nombreuses limites méthodologiques (absence de témoins non exposés, schéma d'exposition peu clair et source de confusion dans l'interprétation, étude de l'effet temps sur une seule dose) et de l'incohérence du rapport entre la toxicité de la voie inhalée et de la voie intra-péritonéale qui ne correspond pas aux données cliniques.

Ainsi, considérant l'absence de donnée humaine et la qualité insuffisante des données animales, aucune VTR pour une exposition court terme n'a pu être proposée pour la voie inhalée. De plus, considérant le manque de données de toxicocinétique et la grande disparité des résultats de DL_{50} observés chez l'animal pour les différentes voies d'exposition, le CES n'a pas jugé pertinent de réaliser une extrapolation voie à voie.

Les experts du CES soulignent l'absence de données pour cette voie d'exposition qui correspond cependant à une voie d'exposition majeure/prépondérante.

7 Proposition de VTR court terme par voie cutanée

Du fait des caractéristiques physico-chimiques de la PLTX (poids moléculaire élevé et hydrosoluble), la voie cutanée par exposition locale n'est pas attendue comme point de passage systémique pour la PLTX. Considérant cet élément et les limites des études décrites pour cette voie (Wiles *et al*., 1974 ; Fujiki *et al*., 1986), les experts du CES n'ont pas retenu ces études comme études clés. **Ainsi, aucune VTR pour une exposition court terme n'a pu être proposée pour la voie cutanée. De plus, considérant le manque de données de toxicocinétique et la grande disparité des résultats de DL_{50} observés chez l'animal pour les différentes voies d'exposition, le CES n'a pas jugé pertinent de réaliser une extrapolation voie à voie.**

8 Proposition de VTR moyen terme par voie orale

8.1 Choix de l'effet critique

Les symptômes observés suite à une exposition moyen terme à la PLTX chez la souris sont une léthargie, une ataxie, des douleurs abdominales, une dyspnée et une piloéréction. Ces effets sont cohérents avec l'ensemble des observations réalisées chez l'animal quel que soit la durée de l'exposition.

Les experts du CES retiennent comme effet critique l'ensemble des symptômes observés pour une exposition moyen terme à la PLTX.

8.2 Analyse des VTR moyen terme existantes

Aucune VTR moyen terme n'a été identifiée.

8.3 Choix de l'étude clé

Deux études sont disponibles. Dans l'étude de Del Favero *et al*. de 2013, l'effet apparaissant à la plus faible dose est la perte de poids chez l'animal. Comme énoncé précédemment (cf. 3.3.2), la perte de poids ne semble pas être l'effet le plus sensible et est, de plus, associée à une diminution de la prise alimentaire. Sur la base de ces éléments, les experts du CES ne retiennent pas cette étude comme étude clé.

La seule étude disponible d'une durée d'exposition moyen terme jugée de qualité suffisante est l'étude de Boente-Juncal *et al*. de 2020b. Les données de cet article montrent que pendant la période d'exposition de 28 jours, les souris ayant reçu une dose quotidienne de 0,03 µg/kg pc/j de PLTX n'ont pas présenté d'effet néfaste notable. Le seul effet statistiquement significatif est une hyperkaliémie (2 souris sur 5) que les experts ont estimé être dans les valeurs usuelles physiologiques pour cette espèce. Cette étude permet donc d'identifier un NOAEL de 0,03 µg/kg et un LOAEL de 0,1 µg/kg sur la base des effets observés à cette dose. Ces résultats permettent aux auteurs de proposer un NOAEL de 0,03 µg/kg pc. Ainsi, **les experts du CES retiennent l'étude de Boente-Juncal *et al*. comme étude clé (Boente-Juncal *et al*., 2020b).** Néanmoins, les experts du CES regrettent que les effets investigués dans cette étude ne soient que la léthargie, les douleurs abdominales, les dyspnées, l'ataxie, et qu'elles ne couvrent pas des effets potentiellement plus graves et pouvant apparaître à des doses plus faibles comme la cardiotoxicité.

8.4 Choix du point de départ

Les préconisations de méthodologie suggèrent de privilégier la construction d'une Benchmark Dose (BMD) chaque fois que les données disponibles le permettent, de retenir un NOAEL en second choix et un LOAEL en dernière option (Anses, 2017).

Les données de cette étude de Boente-Juncal *et al*. de 2020b et la relation dose-réponse des effets observés n'ont pas permis de construire de BMD (Annexe 2).

Les experts du CES retiennent donc le NOAEL comme point de départ, soit un **NOAEL de 0,03 µg/kg pc/j**.

8.5 Ajustement allométrique

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

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

Le poids moyen des souris disponible dans l'étude est de 27 g. Celui utilisé pour l'Homme pour le calcul est de 70 kg.

Le PoD ajusté est de :

NOAEL $_{HED}$ = 0,004 µg/kg pc/j

8.6 Choix des facteurs d'incertitudes

Le calcul de la VTR à partir de l'étude de Boente-Juncal *et al.* de 2020b a été effectué à l'aide des facteurs d'incertitude suivants (Anses, 2017) :

- variabilité inter-espèces (FI_A) : 2,5

L'ajustement dosimétrique réalisé a permis de calculer une dose équivalente humaine, à l'aide de l'équation précédente. Pour tenir compte de la variabilité toxicodynamique et d'incertitudes résiduelles, un facteur d'incertitude supplémentaire a été fixé à 2,5 selon les recommandations de l'OMS-IPCS (OMS-IPCS, 2005) et sur la base des pratiques de l'Anses (Anses, 2017).

- variabilité interindividuelle (FI_H) : 10

Aucune donnée scientifique permettant de réduire la valeur par défaut n'étant disponible, la valeur de 10 est utilisée.

- transposition subchronique à chronique (FI_S) : 1
- utilisation d'un point de départ ($FI_{B/L}$) : 1
- insuffisance des données (FI_D) : 1

Un facteur d'incertitude global de 25 est donc utilisé pour la construction de la VTR.

8.7 Proposition de VTi pour une toxicité répétée par voie orale

Les données disponibles pour une exposition répétée étant limitée (une seule étude disponible), le CES décide de construire une valeur toxicologique indicative (VTi) plutôt qu'une VTR pour laquelle il faudrait appliquer un FI_D supplémentaire. Une VTi est une valeur indicative moins robuste que la VTR présentant ainsi un niveau de confiance faible.

VTi = 0,0002 µg/kg pc/j, soit 0,2 ng/kg pc/j

9 Proposition de VTR moyen terme par voie inhalée

Considérant l'absence de donnée humaine et animale, **aucune VTR pour une exposition moyen terme n'a pu être proposée pour la voie inhalée**. De plus, considérant le manque de données de toxicocinétique et la grande disparité des résultats de DL_{50} observés chez l'animal pour les différentes voies d'exposition, le CES n'a pas jugé pertinent de réaliser une extrapolation voie à voie.

10 Proposition de VTR moyen terme par voie cutanée

Considérant l'absence de donnée humaine et animale, **aucune VTR pour une exposition moyen terme n'a pu être proposée pour la voie cutanée**. De plus, considérant le manque de données de toxicocinétique et la grande disparité des résultats de DL_{50} observés chez l'animal pour les différentes voies d'exposition, le CES n'a pas jugé pertinent de réaliser une extrapolation voie à voie.

11 Conclusion et recommandations du CES

Une VTR aiguë par voie orale (exposition unique) a été élaborée pour la PLTX sur la base d'un NOAEL dérivés à partir de l'étude de Boente-Juncal *et al*. de 2020a avec un niveau de confiance moyen-faible.

Une VTi moyen terme par voie orale a été élaborée après exposition répétée sur la base d'un NOAEL dérivé à partir de l'étude de Boente-Juncal *et al.* de 2020b avec par définition un niveau de confiance faible. Au regard de la base de données très limitée (une seule étude disponible), une VTi est construite par l'Anses lorsque toutes les conditions nécessaires à la construction d'une VTR ne sont pas réunies (insuffisance des données, doute sur le caractère néfaste de l'effet et/ou contraintes de temps et/ou de ressources). Cette approche pragmatique vise à répondre de façon transitoire à l'objectif de l'évaluation des risques sanitaires dans l'attente de données qualitatives et/ou quantitatives suffisantes, et peut donc contribuer à répondre aux attentes des gestionnaires de risque en présence de situations d'exposition documentées. Cette VTi ne peut être utilisée que pour répondre à une situation et un contexte spécifiques qui ont justifié sa construction.

La durée d'application d'une VTR (ou VTi) moyen terme est habituellement définie sur une durée de 15 à 364 jours. Néanmoins, dans ce cas précis, une durée d'application de quelques semaines sera associée à cette VTi en cohérence avec la durée des épisodes de prolifération d'*Ostreopsis* généralement observés en France.

Le CES n'a pas pu élaborer des VTR court et moyen terme pour les voies respiratoire et cutanée pour la palytoxine du fait d'un manque de données pour ces voies.

Tableau 3 : VTR pour la palytoxine

Type de VTR	Organisme constructeur (date)	Effet critique (étude clé)	Construction		VTR
			PoD	FI	
VTR court terme par voie orale	Anses (2022)	Ensemble des symptômes observés (léthargie, ataxie, douleurs abdominales et dyspnée, piloéréction). Boente-Juncal *et al*. (2020a) : étude chez des souris exposées à une dose unique suivi sur 96h heures	NOAEL = 15 µg/kg/j <u>Ajustement allométrique</u> : = 15*(0,022/70)^{0,25} = 2 µg/kg/j	25 FI_{A-TK} = 1 FI_{A-TD} = 2.5 FI_{H} = 10 $FI_{B/L}$ = 1 FI_{D} = 1	**0,08 µg/kg/j** **Niveau de confiance : moyen-faible**
VTi moyen terme par voie orale (quelques semaines)	Anses (2022)	Ensemble des symptômes observés (léthargie, ataxie, douleurs abdominales et dyspnée, piloéréction). Boente-Juncal *et al*. (2020b) : étude chez des souris exposées à des doses de PLTX pendant 28 jours	NOAEL = 0,03 µg/kg pc LOAEL = 0,1 µg/kg/j <u>Ajustement allométrique</u> : = 0,03*(0,027/70)^{0,25} = 0,004 µg/kg/j	25 FI_{A-TK} = 1 FI_{A-TD} = 2.5 FI_{H} = 10 FI_{S}=1 $FI_{B/L}$ = 1 FI_{D} = 1	0,0002 µg/kg pc/j, soit **0,2 ng/kg/j** **Niveau de confiance : moyen-faible**
VTR court et moyen terme par voie respiratoire	Anses (2022)	**Absence de VTR du fait d'un manque de données**			
VTR court et moyen terme par voie cutanée	Anses (2022)	**Absence de VTR du fait d'un manque de données**			

Au vu des éléments détaillés dans cet avis, le CES recommande de réaliser des études complémentaires de toxicité par voie inhalée avec la PLTX et de réaliser des mesures de la concentration en PLTX retrouvée dans les aérosols.

Au vu de l'hétérogénéité des valeurs qui empêche toute extrapolation voie à voie et du fait de l'absence de données toxicocinétiques, le CES recommande également que soient menées des études de toxicocinétiques et de toxicité par administration répétée.

12 Bibliographie

Accoroni, S. et C. Totti. 2016. "The toxic benthic dinoflagellates of the genus ostreopsis in temperate areas: A review." *Advances in Oceanography and Limnology* 7 (1): 1-15. https://doi.org/10.4081/aiol.2016.5591.

Afssa. 2007. Appui scientifique et technique de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la consommation de produits de la mer en présence d'Ostreopsis ovata.

Afssa. 2008. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la pertinence de compléter le dispositif général de surveillance du milieu marin et des aliments mis sur le marché par la prise en compte de la microalgue épibenthique Ostreopsis.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P(2008). Molecular Biology of the Cell. Garland Science. Fifth Edition.

Aligizaki, K., P. Katikou, G. Nikolaidis et A. Panou. 2008. "First episode of shellfish contamination by palytoxin-like compounds from Ostreopsis species (Aegean Sea, Greece)." *Toxicon* 51 (3): 418-427. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.10.016.

Amano, K., K. Sato, M. Hori, H. Ozaki et H. Karaki. 1997. "Palytoxin-induced increase in endothelial Ca2+ concentration in the rabbit aortic valve." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 355(6): 751-758. https://doi.org/10.1007/pl00005009.

Amzil, Z., M. Sibat, N. Chomerat, H. Grossel, F. Marco-Miralles, R. Lemee, E. Nezan et V. Sechet. 2012. "Ovatoxin-a and Palytoxin Accumulation in Seafood in Relation to Ostreopsis cf. ovata Blooms on the French Mediterranean Coast." *Marine Drugs* 10 (2): 477-496. https://doi.org/10.3390/md10020477.

Anses (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail). 2017. Valeurs toxicologiques de reference (VTR). Guide d'élaboration de VTR de l'Anses. Rapport d'expertise collective. Juin 2017. Maisons-Alfort, 186 p.

Artigas, P. et D.C. Gadsby. 2004. "Large diameter of palytoxin-induced Na/K pump channels and modulation of palytoxin interaction by Na/K pump ligands." *J Gen Physiol.* 123(4): 357-76. https://doi.org/10.1085/jgp.200308964.

Berdalet, E., A.S Pavaux, R. Abós-Herràndiz, M. Travers, G. Appéré, M. Vila, J. Thomas, L. de Haro, M. Estrada, N.I. Medina-Pérez, L. Viure, B. Karlson et R. Lemée. 2022. "Environmental, human health and socioeconomic impacts of Ostreopsis spp. blooms in the NW Mediterranean." *Harmful Algae* 119:102320. https://doi.org/10.1016/j.hal.2022.102320.

Bire, R., Trotereau, S., Lem´ee, R., Delpont, C., Chabot, B., Aumond, Y., Krys, S. 2013. "Occurrence of palytoxins in marine organisms from different trophic levels of the French Mediterranean coast harvested in 2009." *Harmful Algae* 28, 10–22. https://doi.org/10.1016/j.hal.2013.04.007.

Bire, R., Trotereau, S., Lem´ee, R., Oregioni, D., Delpont, C., Krys, S., Guerin, T. 2015. "Hunt for Palytoxins in a Wide Variety of Marine Organisms Harvested in 2010 on the French Mediterranean Coast." *Mar. Drugs* 13, 5425–5446. https://doi.org/10.3390/md13085425.

Boente-Juncal, A., C. Vale, M. Camiña, J.M. Cifuentes, M.R. Vieytes, L.M. Botana. 2020a. "Reevaluation of the acute toxicity of palytoxin in mice: Determination of lethal dose 50 (LD50) and No-observed-adverse-effect level (NOAEL)." *Toxicon* 177:16-24. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.01.010.

Boente-Juncal A, Raposo-García S, Vale C, Louzao MC, Otero P, Botana LM . 2020b. "In Vivo Evaluation of the Chronic Oral Toxicity of the Marine Toxin Palytoxin." *Toxins* 12(8): 489. https://doi.org/10.3390/toxins12080489.

Brissard, C., C. Herrenknecht, V. Séchet, F. Hervé, F. Pisapia, J. Harcouet, R. Lémée, N. Chomérat, P. Hess et Z. Amzil. 2014. "Complex toxin profile of French Mediterranean Ostreopsis cf. ovata strains, seafood accumulation and ovatoxins prepurification." *Marine Drugs* 12 (5): 2851-2876. https://doi.org/10.3390/md12052851.

Brissard, C., F. Hervé, M. Sibat, V. Séchet, P. Hess, Z. Amzil et C. Herrenknecht. 2015. "Characterization of ovatoxin-h, a new ovatoxin analog, and evaluation of chromatographic columns for ovatoxin analysis and purification." *Journal of Chromatography A* 1388: 87-101. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.02.015.

Ciminiello, P., C. Dell' Aversano, E. Fattorusso et M. Forino. 2009. Chapter 1 Recent Developments in Mediterranean Harmful Algal Events. Dans Advances in Molecular Toxicology.

Ciminiello, P., C. Dell'Aversano, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino, L. Grauso, L. Tartaglione, F. Guerrini et R. Pistocchi. 2010. "Complex palytoxin-like profile of Ostreopsis ovata. Identification of four new ovatoxins by high-resolution liquid chromatography/mass spectrometry." *Rapid Commun Mass Spectrom* 24 (18): 2735- 44. https://doi.org/10.1002/rcm.4696.

Ciminiello, P., C. Dell'Aversano, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino, L. Grauso, L. Tartaglione, F. Guerrini, L. Pezzolesi, R. Pistocchi et S. Vanucci. 2012. "Isolation and structure elucidation of ovatoxin-a, the major toxin produced by Ostreopsis ovata." Journal of the American Chemical Society 134 (3): 1869-1875. https://doi.org/10.1021/ja210784u.

Ciminiello, P., C. Dell'Aversano, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino, L. Tartaglione, R. Rossi, V. Soprano, D. Capozzo et L. Serpe. 2011. "Palytoxin in seafood by liquid chromatography tandem mass spectrometry: Investigation of extraction efficiency and matrix effect." Analytical and Bioanalytical Chemistry 401 (3): 1043-1050. https://doi.org/10.1007/s00216-011-5135-8.

Ciminiello, P., C. Dell'Aversano, E. Fattorusso, M. Forino, G.S. Magno, L. Tartaglione, C. Grillo et N. Melchiorre. 2006. "The Genoa 2005 outbreak. Determination of putative palytoxin in mediterranean Ostreopsis ovata by a new liquid chromatography tandem mass spectrometry method." *Analytical Chemistry* 78 (17): 6153-6159. https://doi.org/10.1021/ac060250j.

Ciminiello, P., C. Dell'Aversano, E. Fattorusso, M. Forino, L. Tartaglione, C. Grillo et N. Melchiorre. 2008. "Putative Palytoxin and Its New Analogue, Ovatoxin-a, in Ostreopsis ovata Collected Along the Ligurian Coasts During the 2006 Toxic Outbreak." *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 19 (1): 111-120. https://doi.org/10.1016/j.jasms.2007.11.001.

Ciminiello, P., C. Dell'Aversano, E. D. Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino, L. Tartaglione, G. Benedettini, M. Onorari, F. Serena, C. Battocchi, S. Casabianca et A. Penna. 2014. "First finding of Ostreopsis cf. ovata toxins in marine aerosols." *Environmental Science and Technology* 48 (6): 3532-3540. https://doi.org/10.1021/es405617d.

Clausen, M.V., F. Hilbers et H. Poulsen. 2017."The Structure and Function of the Na,K-ATPase Isoforms in Health and Disease." *Front Physiol*. 6;8:371. https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00371.

Crinelli, R., E. Carloni, E. Giacomini, A. Penna, S. Dominici, C.Battocchi, P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, E. Fattorusso, M. Forino, L. Tartaglione et M. Magnani. 2012. "Palytoxin and an Ostreopsis toxin extract increase the levels of mRNAs encoding inflammation-related

proteins in human macrophages via p38 MAPK and NF-κB." *PLoS One* 7(6): e38139. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038139.

Deeds, J.R., M.D. Schwartz. 2010. "Human risk associated with palytoxin exposure". *Toxicon* 56(2):150-62. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.05.035.

Deeds JR, Handy SM, White KD, Reimer JD (2011) Palytoxin Found in *Palythoa* sp. Zoanthids (Anthozoa, Hexacorallia) Sold in the Home Aquarium Trade. PLoS ONE 6(4): e18235. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018235.

Deguchi, T., N. Urakawa et S. Takamatsu. 1976. "Some pharmacological properties of palythoatoxin isolated from the zoanthid, Palythoa tuberculosa." In: Ohsaka, A., Hayashi, K., Sawai, Y. (Eds.), Animal, Plant and Microbial Toxins, vol. 2. Plenum Press, New York, pp. 379–394

Del Favero, G., S. Sosa, M. Pelin, E. D'Orlando, C. Florio, P. Lorenzon, M. Poli et A. Tubaro. 2013. "Sanitary problems related to the presence of Ostreopsis spp. in the Mediterranean Sea: A multidisciplinary scientific approach." Annali dell'Istituto Superiore di Sanita 48 (4): 407-414. https://doi.org/10.4415/ANN_12_04_08.

EFSA Journal. (2009). Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Palytoxin group

7(12):1393.

Fernández D.A., M.C. Louzao, N. Vilariño, B. Espiña, M. Fraga, M.R. Vieytes, A. Román, M. Poli et L.M. Botana. 2013. "The kinetic, mechanistic and cytomorphological effects of palytoxin in human intestinal cells (Caco-2) explain its lower-than-parenteral oral toxicity." *FEBS J*. 280(16):3906-19. https://doi.org/10.1111/febs.12390.

Fujiki, H., M. Suganuma, M. Nakayasu, H. Hakii, T. Horiuchi, S. Takayama et T. Sugimura. 1986. « Palytoxin is a non-12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate type tumor promoter in two-stage mouse skin carcinogenesis." *Carcinogenesis* 7(5): 707-710. https://doi.org/10.1093/carcin/7.5.707.

Fraga, M., N. Vilariño, M. C. Louzao, L. Molina, Y. López, M. Poli et L. M. Botana. 2017. "First Identification of Palytoxin-Like Molecules in the Atlantic Coral Species Palythoa canariensis." *Analytical Chemistry* 89 (14): 7438-7446. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01003.

Funari, E., M. Manganelli et E. Testai. 2015. "Ostreospis cf. ovata blooms in coastal water: Italian guidelines to assess and manage the risk associated to bathing waters and recreational activities." *Harmful Algae* 50: 45-56. https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.10.008.

García-Altares, M., L. Tartaglione, C. Dell'Aversano, O. Carnicer, P. De La Iglesia, M. Forino, J. Diogène et P. Ciminiello. 2015. "The novel ovatoxin-g and isobaric palytoxin (so far referred to as putative palytoxin) from Ostreopsis cf. ovata (NW Mediterranean Sea): Structural insights by LC-high resolution MSn." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407 (4): 1191-1204. https://doi.org/10.1007/s00216-014-8338-y.

Gemin, M.P. 2020. "Effets in situ et in vitro des paramètres environnementaux sur l'abondance, le métabolome et le contenu toxinique de l'Ostreopsis d. ovata et purification des ovatoxines." http://www.theses.fr/2020NANT4059.

Guennoun-Lehmann, S., J.E. Fonseca, J.D. Horisberger et R.F. Rakowski. 2007. "Palytoxin acts on Na(+),K (+)-ATPase but not nongastric H(+),K (+)-ATPase." *J Membr Biol.* 216(2-3):107-16. https://doi.org/10.1007/s00232-007-9040-1.

Habermann E. 1989. "Palytoxin acts through Na+,K+-ATPase." *Toxicon* 27(11): 1171-1187. https://doi.org/10.1016/0041-0101(89)90026-3.

Hoffmann, K., M. Hermanns-Clausen, C. Buhl, M. W. Büchler, P. Schemmer, D. Mebs et S. Kauferstein. 2008. "A case of palytoxin poisoning due to contact with zoanthid corals through a skin injury." *Toxicon* 51 (8): 1535-1537. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.03.009.

Illoul, H., F. Rodríguez, M. Vila, N. Adjas, A. A. Younes, M. Bournissa, A. Koroghli, N. Marouf, S. Rabia et F. L. K. Ameur. 2012. "The genus ostreopsis along the algerian coastal waters (SW Mediterranean Sea) associated with a human respiratory intoxication episode." Cryptogamie, Algologie 33 (2): 209-216. https://doi.org/10.7872/crya.v33.iss2.2011.209.

Inuzuka, T., D. Uemura et H. Arimoto. 2008. "The conformational features of palytoxin in aqueous solution." Tetrahedron 64 (33): 7718-7723. https://doi.org/10.1016/j.tet.2008.06.025.

IPCS (International Programme on Chemical Safety) (2005) Harmonization Project Document No. 2 Chemical-specific adjustment factors for interspecies differences and human variability : guidance document for use of data in dose/concentration assessment. (OMS, Genève) 100p.

Ito, K., N. Urakawa, et K. Koike. 1982. "Cardiovascular toxicity of palytoxin in anesthetized dogs." *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 258(1): 146-154.

Ito, E., M. Ohkusu et T. Yasumoto. 1996. "Intestinal injuries caused by experimental palytoxicosis in mice." *Toxicon* 34(6): 643-652. https://doi.org/10.1016/0041-0101(96)00005-0.

Ito, E., M. Ohkusu, K. Terao et Yasumoto T. 1997. "Effects of repeated injections of palytoxin on lymphoid tissues in mice." *Toxicon* 35(5): 679-688. https://doi.org/10.1016/s0041-0101(96)00184- 5.

Ito, E., T. Yasumoto. 2009. "Toxicological studies on palytoxin and ostreocin-D administered to mice by three different routes." *Toxicon*. 54(3): 244-251. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.04.009.

Katikou, P. et A. Vlamis. 2014. "Palytoxin and analogs: Ecobiology and origin, chemistry and chemical analysis." In: Seafood and freshwater toxins: Pharmacology, physiology, and detection. Edited by Botana LM, Third edn: CRC Press, Taylor & Francis group; 46 pages.

Kerbrat, A.S., Z. Amzil, R. Pawlowiez, S. Golubic, M. Sibat, H.T. Darius, M. Chinain et D. Laurent. 2011. "First evidence of palytoxin and 42-hydroxy-palytoxin in the marine cyanobacterium Trichodesmium." *Marine Drugs* 9 (4): 543-560. https://doi.org/10.3390/md9040543.

Kockskämper, J., Von Lewinski, D. Khafaga, M. Elgner, A. Grimm, M. Eschenhagen, T. Gottlieb, P.A. Sachs, F. Pieske, B. (2008). The slow force response to stretch in atrial and ventricular myocardium from human heart: Functional relevance and subcellular mechanisms, Progress in Biophysics and Molecular Biology, 97 (2–3): 250-267.

Maeda, M., R. Kodama, T. Tanaka, H. Yoshizumi, K. Nomoto, T. Takemoto et M. Fujita. 1985. "Structure of insecticidal substances isolated from a red alga, Chondria armata." Symposium Papers, 27thSymposium on the Chemistry of Natural Products, pp616-623,Yamawaki Publishing, Hiroshima, Japan.

Mazzeo, A., M. Varra, L. Tartaglione, P. Ciminiello, Z. Zendong, P. Hess et C. Dell'aversano. 2021. "Toward isolation of palytoxins: Liquid chromatography coupled to low-or high resolution mass spectrometry for the study on the impact of drying techniques, solvents and materials." Toxins 13 (9). https://doi.org/10.3390/toxins13090650.

Medina-Pérez, N. I., M. Dall'osto, S. Decesari, M. Paglione, E. Moyano et E. Berdalet. 2021. "Aerosol Toxins Emitted by Harmful Algal Blooms Susceptible to Complex Air-Sea

Interactions." *Environmental Science and Technology* 55 (1): 468-477. https://doi.org/10.1021/acs.est.0c05795.

Moore, R.E. et G. Bartolini. 1981. "Structure of Palytoxin." Journal of the American Chemical Society 103(9): 2491-2494.

Moore, R.E., P. Helfrich et G.M.L. Patterson. 1982. "The deadlyseaweed of Hana." *Oceanus* 25: 54–63.

Moore, R.E. et P.J. Scheuer. 1971. "Palytoin: A new marine toxin from a coelenterate." *Science* 172 (172): 495-498. https://doi.org/10.1126/science.172.3982.495.

Munday, R. 2006. "Toxicological requirements for risk assessment of shellfish contaminants: a review." *Afr. J. Mar. Sci*. 28, 447-449.

Munday R. 2008. "Occurrence and Toxicology of Palytoxins." In: Botana LM, editor. Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection. 2nd ed. CRC Press/Taylor & Francis Group; Boca Raton, FL, USA. pp. 693-713.

Munday R. 2011. "Palytoxin toxicology: animal studies." *Toxicon*. 57(3): 470-477. http://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.10.003.

Paradis, C. et M. Labadie. 2022. "Effets sanitaires liés à la présence de microalgues du genre Ostreopis sur la côte basque au cours de l'été 2021." Rapport du CHU/Centre Antipoison de Bordeaux, 33 pages.

Patocka, J., E. Nepovimova, Q. Wu et K. Kuca. 2018. "Palytoxin congeners." *Archives of Toxicology* 92 (1): 143-156. https://doi.org/10.1007/s00204-017-2105-8.

Pelin, M., C. Zanette, M. De Bortoli, S. Sosa, R.D. Loggia, A. Tubaro et C. Florio. 2011. "Effects of the marine toxin palytoxin on human skin keratinocytes: role of ionic imbalance." *Toxicology* 282(1-2): 30 38. http://doi.org/10.1016/j.tox.2011.01.010.

Pelin, M., S. Boscolo, M. Poli, S. Sosa, A. Tubaro et C. Florio. 2013. "Characterization of palytoxin binding to HaCaT cells using a monoclonal anti-palytoxin antibody." *Mar Drugs*. 26;11(3):584-98. https://doi.org/10.3390/md11030584.

Pelin, M., S. Sosa, S. Pacor, A. Tubaro et C. Florio. 2014. "The marine toxin palytoxin induces necrotic death in HaCaT cells through a rapid mitochondrial damage." *Toxicol Lett*. 229(3): 440-50. http://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.07.022.

Pelin, M., G. Stocco, C. Florio, S. Sosa et A. Tubaro. 2020. "In Vitro Cell Sensitivity to Palytoxin Correlates with High Gene Expression of the Na+/K+-ATPase β2 Subunit Isoform." *Int J Mol Sci*. 14;21(16):5833. https://doi.org/10.3390/ijms21165833.

Poli, M., P. Ruiz-Olvera, A. Nalca, S. Ruiz, V. Livingston, O. Frick, D. Dyer, C. Schellhase, J. Raymond, D. Kulis, D. Anderson, S. McGrath et J. Deeds. 2018. "Toxicity and pathophysiology of palytoxin congeners after intraperitoneal and aerosol administration in rats." *Toxicon*. 150:235-250. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.06.067.

Rhodes, L., N. Towers, L. Briggs, R. Munday et J. Adamson. 2002. "Uptake palytoxin-like compounds by shellfish fed Ostreopsis siamensis (Dinophyceae)." *NZ J. Mar. Freshw. Res.* 36, 631–636. https//:doi.org/10.1080/00288330.2002.9517118.

Riobó P., B. Paz, J.M. Franco, J.A. Vázquez, M.A. Murado et E. Cacho. 2008. "Mouse bioassay for palytoxin. Specific symptoms and dose-response against dose-death time relationships." *Food Chem Toxicol.* 46(8): 2639-2647. https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.04.020.

Rossini, G.P. et A. Bigiani. 2011. "Palytoxin action on the Na+,K+-ATPase and the disruption of ion equilibria in biological systems." *Toxicon*. 57(3): 429-39. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.09.011.

Sansoni, G., B. Borghini, G. Camici, M. Cassoti, P. Righini et C. Rustighi. 2003. "Fioriture algali di Ostreopsis ovata (Gony aulacales: Dinophyceae): un problema emergent." *Biologia ambientale* 17 (1): 17-23.

Santos, M., P. B. Oliveira, M. T. Moita, H. David, M. F. Caeiro, A. Zingone, A. Amorim et A. Silva. 2019. "Ocurrence of Ostreopsis in two temperate coastal bays (SW iberia): Insights from the plankton." *Harmful Algae* 86: 20-36. https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.03.003.

Satoh, E., Ishii, T., & Nishimura, M. (2003). Palytoxin-induced increase in cytosolic-free Ca(2+) in mouse spleen cells. European journal of pharmacology, 465(1-2), 9–13. https://doi.org/10.1016/s0014-2999(03)01459-6.

Satoh, E., & Nakazato, Y. (1991). Mode of action of palytoxin on the release of acetylcholine from rat cerebrocortical synaptosomes. Journal of neurochemistry, 57(4), 1276–1280. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1991.tb08290.x

Scheiner-Bobis G. (2002). The sodium pump. Its molecular properties and mechanics of ion transport. European journal of biochemistry, 269(10), 2424–2433. https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.02909.x

Scheiner-Bobis, G., D. Meyer zu Heringdorf, M. Christ et E. Habermann. 1994. «Palytoxin induces K+ efflux from yeast cells expressing the mammalian sodium pump." *Mol Pharmacol.* 45(6): 1132-1136.

Schilling, W.P., D. Snyder, W.G. Sinkins et M. Estacion. 2006. "Palytoxin-induced cell death cascade in bovine aortic endothelial cells." *Am J Physiol Cell Physiol*. 291(4): C657-C667. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00063.2006.

Seemann, P., C. Gernert, S. Schmitt, D. Mebs et U. Hentschel. 2009. "Detection of hemolytic bacteria from Palythoa caribaeorum (Cnidaria, Zoantharia) using a novel palytoxin screening assay." AntonieVan Leeuwenhoek, (96): 405–411. https://doi.org/10.1007/s10482-009-9353-4.

Sosa, S., G. Del Favero, M. De Bortoli, F. Vita, M.R. Soranzo, D. Beltramo, M. Ardizzone et A. Tubaro. 2009. "Palytoxin toxicity after acute oral administration in mice." *Toxicol Lett*. D191(2-3): 253-259. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.09.009.

Sosa, S., Pelin, M., Ponti, C., Carlin, M., & Tubaro, A. (2022). Acute Toxicity by Oral Co-Exposure to Palytoxin and Okadaic Acid in Mice. Marine drugs, 20(12), 735. https://doi.org/10.3390/md20120735.

Takeuchi, A., Reyes, N., Artigas, P., & Gadsby, D. C. (2009). Visualizing the mapped ion pathway through the Na,K-ATPase pump. Channels (Austin, Tex.), 3(6), 383–386. https://doi.org/10.4161/chan.3.6.9775Taniyama, S., O. Arakawa, M. Terada, S. Nishio, T. Takatani, Y. Mahmud et T. Noguchi. 2003. "Ostreopsis sp., a possible origin of palytoxin (PTX) in parrotfish Scarus ovifrons." Toxicon 42 (1): 29-33. https://doi.org/10.1016/S0041-0101(03)00097-7.

Tartaglione, L., E. Dello Iacovo, A. Mazzeo, S. Casabianca, P. Ciminiello, A. Penna et C. Dell'Aversano. 2017. "Variability in Toxin Profiles of the Mediterranean Ostreopsis cf. ovata and in Structural Features of the Produced Ovatoxins." E*nvironmental Science and Technology* 51 (23): 13920-13928. https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03827.

Tatsumi, M., M. Takahashi et Y. Ohizumi. 1984. "Mechanism of palytoxin-induced [3H]norepinephrine release from a rat pheochromocytoma cell line." *Mol Pharmacol*. 25(3): 379-383.

Terao K.K., E. Ito et Y. Yasumoto. 1992. "Light and electron microscopic observation of experimental palytoxin poisoning in mice." *Bull Soc Pathol Exot*. 85(5 Pt 2): 494-6.

Tichadou, L., M. Glaizal, A. Armengaud, H. Grossel, R. Lemée, R. Kantin, J. L. Lasalle, G. Drouet, L. Rambaud, P. Malfait et L. De Haro. 2010. "Health impact of unicellular algae of the Ostreopsis genus blooms in the Mediterranean Sea: Experience of the French Mediterranean coast surveillance network from 2006 to 2009." Clinical Toxicology 48 (8): 839-844. https://doi.org/10.3109/15563650.2010.513687.

Tosteson, M.T., D.R. Scriven, A.K. Bharadwaj, Y. Kishi et D.C. Tosteson. 1995." Interaction of palytoxin with red cells: structure-function studies." *Toxicon* 33(6):799-807. https://doi.org/10.1016/0041-0101(95)00010-j.

Totti, C., S. Accoroni, F. Cerino, E. Cucchiari et T. Romagnoli. 2010. "Ostreopsis ovata bloom along the Conero Riviera (northern Adriatic Sea): Relationships with environmental conditions and substrata." *Harmful Algae* 9 (2): 233-239. https://doi.org/10.1016/j.hal.2009.10.006.

Tubaro A, Del Favero G, Beltramo D, Ardizzone M, Forino M, De Bortoli M, Pelin M, Poli M, Bignami G, Ciminiello P, Sosa S. (2011). Acute oral toxicity in mice of a new palytoxin analog: 42-hydroxy-palytoxin. *Toxicon*. 57(5): 755-763. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.02.009.

Uemura, D., Y. Hirata, T. Iwashita et H. Naoki. 1985. "Studies on palytoxins." *Tetrahedron* 41(6):1007-1017.

Uemura, D., K. Ueda, Y. Hirata, H. Naoki et T. Iwashita. 1981a. "Further studies on palytoxin I." *Tetrahedron Letters* 22(20): 1909-1912.

Uemura, D., K. Ueda, Y. Hirata, H. Naoki et T. Iwashita. 1981b. "Further studies on palytoxin II. structure of palytoxin." *Tetrahedron Letters* 2781-2784: 1909-1912.

Vadász, I., S. Raviv et J.I. Sznajder. 2007. "Alveolar epithelium and Na,K-ATPase in acute lung injury." *Intensive Care Med.* 33(7):1243-1251. https://doi.org/10.1007/s00134-007-0661-8.

Vick, J.A. et J.S. Wiles. 1975. "The mechanism of action and treatment of palytoxin poisoning." *Toxicol Appl Pharmacol.* 34(2): 214-223. https://doi.org/10.1016/0041-008x(75)90026-5.

Wang, X. et J.D. Horisberger. 1997. "Palytoxin effects through interaction with the Na,K-ATPase in Xenopus oocyte." *FEBS Lett.* 409(3):391-5. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)00559-0.

Wattenberg E. V. (2007). Palytoxin: exploiting a novel skin tumor promoter to explore signal transduction and carcinogenesis. American journal of physiology. Cell physiology, 292(1), C24–C32. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00254.2006.

Wiles, J.S., J.A. Vick et M.K. Christensen. 1974. "Toxicological evaluation of palytoxin in several animal species." *Toxicon* 12(4): 427-33. https://doi.org/10.1016/0041-0101(74)90011-7.

Wu, C.H. 2009. "Palytoxin: membrane mechanisms of action." *Toxicon* 54(8): 1183-9. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.02.030.

Wu, M.L., C.C. Yang, J.F. Deng et K.Y. Wang. 2014. "Hyperkalemia, hyperphosphatemia, acute kidney injury, and fatal dysrhythmias after consumption of palytoxin-contaminated goldspot herring." *Ann Emerg Med.* 64(6):633-6. https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2014.06.001.

Yoshizumi, M., A. Nakanishi, H. Houchi, K. Morita, I. Katoh et M. Oka. 1991. "Characterization of palytoxin-induced catecholamine secretion from cultured bovine adrenal chromaffin cells. Effects of Na+- and Ca2+-channel blockers." *Biochem Pharmacol*. 42(1): 17-23. https://doi.org/10.1016/0006-2952(91)90675-u.

ANNEXES

Annexe 1 : Lettre de saisine

GOUVERNEMENT
Liberté
Égalité
Fraternité

2021-SA-0212

Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
Direction générale de l'alimentation

Ministère des Solidarités et de la Santé
Direction générale de la santé

Nos réf. : D-21-029006

Paris, le - 3 DEC. 2021

Le directeur général de l'alimentation
Le directeur général de la santé

à

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

4 rue Pierre et Marie Curie
94701 Maisons-Alfort Cedex

Objet : Demande d'avis de l'Anses relatif aux risques liés aux efflorescences d'Ostreopsis spp. sur l'ensemble du littoral français

Durant le mois d'août 2021, plus de 600 personnes ont déclaré des symptômes d'intoxication après avoir fréquenté des plages de la côte basque. Ces intoxications ont été mises en relation avec une efflorescence d'un dinoflagellé phytoplanctonique du genre *Ostreopsis*. Cette microalgue benthique avait déjà été signalée dès septembre 2020 sur la côte basque.

A la suite d'un épisode d'efflorescence d'*Osteopsis* spp. dans l'eau de mer, l'exposition par voie respiratoire (contact avec les embruns lors de promenade, de surveillance des plages...), par contact cutané avec de l'eau de mer (baignade, activité nautique...) ou par ingestion (notamment par la consommation de produits de la mer contaminés par les toxines d'*Ostreopsis* spp.) est susceptible de provoquer des manifestations cliniques polymorphes telles que : toux, rhinorrhée, irritations de la sphère ORL et des yeux, céphalées, fièvre, difficultés respiratoires, nausées, vomissements, diarrhées, douleurs abdominales, myalgies, rougeurs, démangeaisons ou saignements de nez. Lors de ce dernier épisode, certains cas graves d'intoxications ont nécessité des hospitalisations.

L'augmentation brutale du nombre de cas enregistrés par le Centre antipoison et de toxicovigilance (CAP-TV) de Bordeaux en août 2021 a conduit à prendre des mesures de gestion immédiates sur les plages de la côte basque, alors même que l'espèce exacte d'*Ostreopsis* et la (les) toxine(s) incriminée(s) n'étaient pas encore identifiées : fermeture temporaire de plages (pendant quelques jours), information du public (notamment par le biais d'affichage et de communiqués de presse), sensibilisation et mobilisation du corps médical pour identifier les cas.

251 rue de Vaugirard – 75732 Paris cedex 15 – Tél. 01 49 55 49 55 – www.agriculture.gouv.fr
14 avenue Duquesne – 75350 Paris 07 SP - Tél. 01 40 56 60 00 - www.social-sante.gouv.fr

Le traitement de vos données est nécessaire à la gestion de votre demande et entre dans le cadre des missions confiées aux ministères sociaux.
Conformément au règlement général sur la protection des données (RGPD), vous pouvez exercer vos droits à l'adresse dgs-rgpd@sante.gouv.fr ou par voie postale.
Pour en savoir plus : https://solidarites-sante.gouv.fr/ministere/article/donnees-personnelles-et-cookies

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

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

Contexte :

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

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

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

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

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

- . L'avis scientifique et technique du 22/08/2007 (saisine n°2007-SA-0227[1]) apporte des bilans de connaissance relatives :
    - aux toxines produites par les microalgues du genre *Ostreopsis* (dont *ovata* et *siamensis*) ;
    - à la possibilité de transfert dans la chaîne alimentaire des toxines produites par les microalgues du genre *Ostreopsis* ;
    - aux méthodes d'analyse, biologiques et physicochimimiques, utilisables en routine ou en développement (recherche) ;
    - aux seuils de toxicité connus, et l'Afssa avait conclu qu'il n'en existait pas pour la palytoxine et les palytoxine-like.

[1] https://www.anses.fr/fr/system/files/RCCP2007sa0227.pdf

- L'avis du 11/07/2008 (saisine n°2007-SA-0303[2] liée à la saisine précédente) apporte les informations complémentaires relatives :
  - à des pistes d'amélioration du dispositif de surveillance d'*Ostreopsis* spp dans le milieu marin et dans les aliments ;
  - aux études nécessaires pour mieux caractériser le risque alimentaire.

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

A la lumière des avis de l'Afssa sus-visés et afin de prévenir la survenue de cas d'intoxication liés à la présence d'*Ostreopsis ovata* en Méditerranée, une note de service DGS[4] a été diffusée courant septembre 2010. Cette instruction propose des modalités de surveillance, de gestion des efflorescences et de communication. Toutefois, si elle cible l'ensemble des espèces du groupe *Ostreopsis*, elle ne porte que sur la problématique rencontrée en Méditerranée, rendant difficile son application lors de l'épidémie survenue sur la côte basque en août dernier. Une mise à jour de celle-ci pourrait donc s'avérer nécessaire, impliquant une actualisation des connaissances scientifiques relatives aux *Ostreopsis* spp et à leurs toxines.

Portée de la saisine :

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

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

[2] https://www.anses.fr/fr/system/files/RCCP2007sa0303.pdf
[3] https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2009.1393
[4] Note de service DGS/EA3/EA4 n° 2010-238 du 30 juin 2010 relative à la surveillance sanitaire et environnementale et aux modalités de gestion des risques sanitaires pour la saison balnéaire 2010, liés à la présence de la microalgue toxique *Ostreopsis* spp. dans les eaux de baignade en méditerranée et à la contamination par ses toxiques des produits de la mer issus de la pêche de loisir : https://solidarites-sante.gouv.fr/fichiers/bo/2010/10-08/ste_20100008_0100_0161.pdf

3/4

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

Délai souhaité :

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

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

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

Le directeur général
de l'alimentation

Bruno FERREIRA

BRUNO FERREIRA ID

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

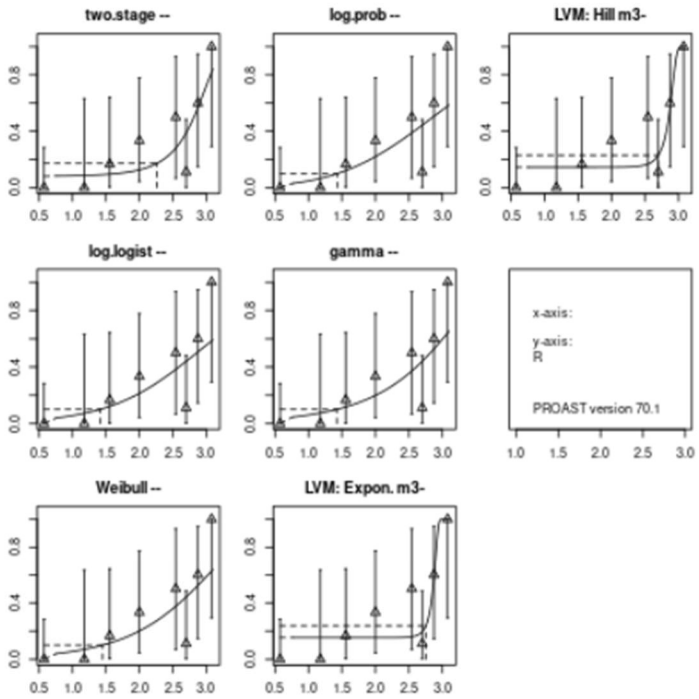
Le directeur général
de la santé

Jérôme SALOMON

Annexe 2 : Modélisation benchmark dose (BMD) pour une exposition court terme

- Modélisation de relation dose réponse en considérant la léthargie :

Graphical output



Fitted models

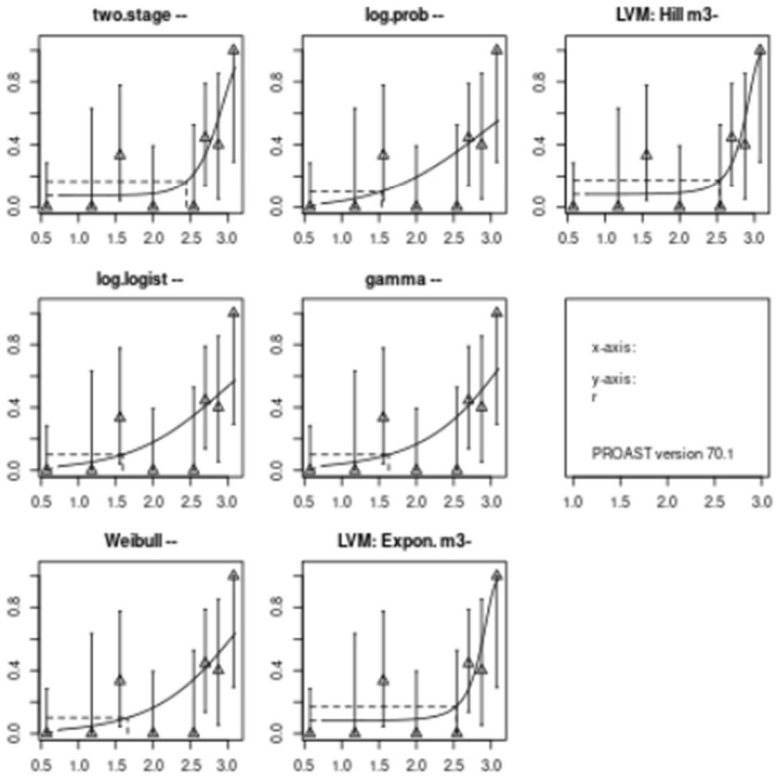
model	No.par	loglik	AIC	accepted	BMDL	BMDU	BMD	conv
null	1	-26.1	54.2	NA	NA	NA	NA	NA
full	8	-15.8	47.6	NA	NA	NA	NA	NA
two.stage	3	-20.61	47.22	yes	58.3	459	184	yes
log.logist	3	-20.44	46.88	yes	0.0131	113	25.9	yes
Weibull	3	-20.31	46.62	yes	0.0198	126	28.2	yes
log.prob	3	-20.45	46.9	yes	0.0252	101	27.1	yes
gamma	3	-20.24	46.48	yes	0.0143	122	26.5	yes
LVM: Expon. m3-	3	-19.87	45.74	yes	4.2	757	568	yes
LVM: Hill m3-	3	-19.95	45.9	yes	0.993	671	502	yes

BMD confidence interval

lowest BMDL	highest BMDU	nr. of models
0.0131	757	7

- Modélisation de relation dose réponse en considérant la douleur abdominale :

Graphical output



Fitted models

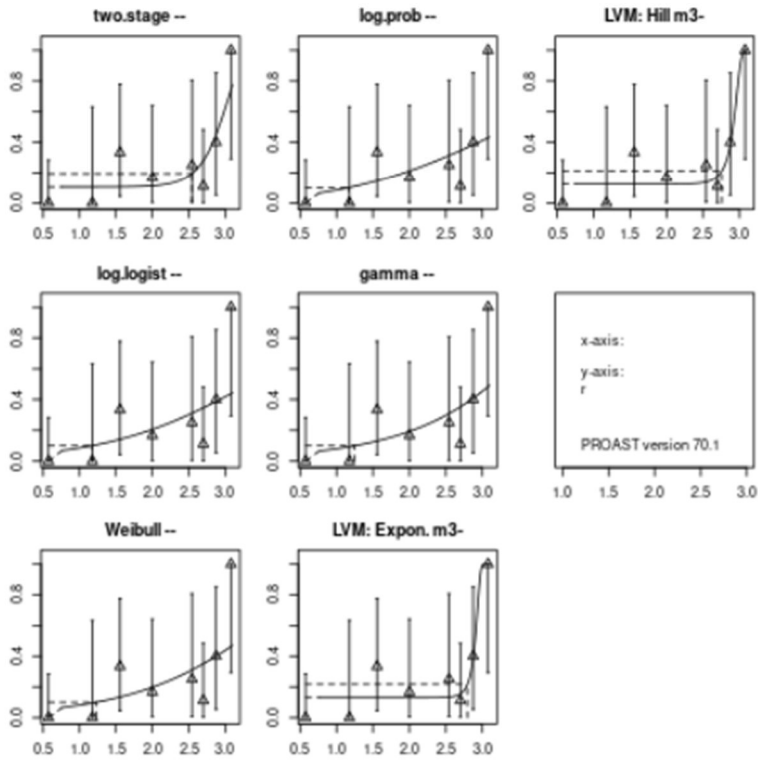
model	No.par	loglik	AIC	accepted	BMDL	BMDU	BMD	conv
null	1	-25.03	52.06	NA	NA	NA	NA	NA
full	8	-13.37	42.74	NA	NA	NA	NA	NA
two.stage	3	-18.38	42.76	yes	206	422	279	yes
log.logist	3	-19.52	45.04	no	NA	NA	39	yes
Weibull	3	-19.28	44.56	no	NA	NA	45.9	yes
log.prob	3	-19.64	45.28	no	NA	NA	34.1	yes
gamma	3	-19.17	44.34	no	NA	NA	42.6	yes
LVM: Expon. m3-	3	-18.14	42.28	yes	17	667	344	yes
LVM: Hill m3-	3	-18.14	42.28	yes	16.2	638	344	yes

BMD confidence interval

lowest BMDL	highest BMDU	nr. of models
16.2	667	3

- Modélisation de relation dose réponse en considérant la dyspnée :

Graphical output



Fitted models

model	No.par	loglik	AIC	accepted	BMDL	BMDU	BMD	conv
null	1	-23.84	49.68	NA	NA	NA	NA	NA
full	8	-15.28	46.56	NA	NA	NA	NA	NA
two.stage	3	-19.51	45.02	no	NA	NA	348	no
log.logist	3	-20.16	46.32	no	NA	NA	14.7	yes
Weibull	3	-20.08	46.16	no	NA	NA	17.1	yes
log.prob	3	-20.19	46.38	no	NA	NA	14.5	yes
gamma	3	-19.99	45.98	no	NA	NA	17.8	yes
LVM: Expon. m3-	3	-18.06	42.12	yes	278	848	626	yes
LVM: Hill m3-	3	-18.12	42.24	yes	269	743	574	yes

BMD confidence interval

lowest BMDL	highest BMDU	nr. of models
269	848	2

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
Tél : 01 42 76 40 40
www.anses.fr — @Anses_fr

ISBN 979-10-286-0468-4 - Dépôt légal : juin 2023 - Anses Éditions 2023 - CC BY-NC-ND