

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 15 juillet 2013

EXTRAIT de l'AVIS du 15 juillet 2013 de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

**relatif à l'amélioration du dispositif de gestion des risques liés aux toxines
amnésiennes en lien avec la contamination persistante observée au large de la Baie
de Seine dans les coquilles Saint-Jacques**

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

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

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

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

Ses avis sont rendus publics.

L'Anses a été saisie, le 16 août 2012, par la Direction générale de l'Alimentation (DGAI), d'une demande d'avis sur des questions techniques relatives au risque dû aux toxines amnésiennes (ou ASP pour « *Amnesic Shellfish Poisoning* ») en lien avec la contamination persistante observée au large de la Baie de Seine dans les coquilles Saint-Jacques.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Le règlement (CE) n° 853/2004 fixe une teneur maximale en toxines ASP¹ dans les coquillages. Celle-ci conditionne la possibilité de mise sur le marché des denrées en question: si la limite de 20 mg kg⁻¹ d'acide domoïque (AD) dans les parties comestibles (corps entier ou toute partie consommable séparément) est dépassée la denrée ne peut être mise sur le marché en l'état.

Cependant, conformément à la décision de la commission N°2002/226/CE, les coquilles St. Jacques des espèces *Pecten maximus* et *Pecten jacobaeus* peuvent subir un

¹ l'acide domoïque (AD) représente la toxine prédominante de la famille des toxines amnésiennes.

traitement assainissant sous contrôle (par éviscération c'est à dire un retrait au minimum de la glande digestive, du manteau et de toute autre partie contaminée) si la contamination de la zone de pêche reste cantonnée à des niveaux maîtrisés, démontrés par une surveillance hebdomadaire du milieu (teneur maximale de 250 mg kg⁻¹ dans le corps entier et 4,6 mg kg⁻¹ dans les parties destinées à la consommation). Les produits destinés à la consommation sont alors constitués des muscles adducteurs seuls (noix) et des gonades (corail).

Au large des côtes normandes, des contaminations récurrentes du gisement de coquilles Saint-Jacques sont observées, qui conduisent à une vigilance accrue et à des mesures d'interdiction de pêche ou au recours à la filière canalisée d'éviscération dans des établissements agréés à cet effet, quand cela est possible au regard des obligations de la décision 2002/226/CE.

Conformément au règlement (CE) n° 854/2004, les autorités françaises ont mis en place un réseau de surveillance des niveaux d'ASP via le réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines (REPHY) piloté par l'IFREMER et via une instruction adaptée pour la gestion du traitement par éviscération.

La DGAL souhaite, avant la reprise des activités de pêche, pouvoir, si cela est possible, améliorer le dispositif de gestion de cette problématique mis en place localement.

A cet effet, la DGAL souhaite, si besoin en collaboration avec l'IFREMER, l'appui de l'ANSES, à la fois en tant que LNR et en tant qu'unité d'évaluation des risques physico-chimiques liés aux aliments sur deux points :

- 1- la possibilité de réaliser des tests rapides (notamment à l'aide des kits immunoenzymatiques de type ELISA²) pour la détection de l'ASP dans les coquillages ;
 - o Ces tests sont-ils disponibles en France ?
 - o Quelles en sont les performances, notamment en termes de sensibilité et spécificité ?
 - o Sont-ils utilisables pour les contrôles officiels, si possible en premier recours pour un screening avec confirmation et détermination des concentrations des échantillons positifs ?
- 2- l'influence de la congélation des produits entiers (avec la glande digestive) puis la décongélation avant éviscération sur la répartition des toxines ASP dans l'animal entier.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'Anses a confié au comité d'experts spécialisés « Evaluation des risques chimiques dans les aliments » (CES ERCA) l'instruction de cette saisine. L'expertise s'est appuyée sur deux documents présentés au CES ERCA le 26 février 2013 :

- une expertise interne relative à l'existence de tests de détection rapide de toxines ASP et à leur performance, réalisée par le Laboratoire National de Référence pour le contrôle des biotoxines marines du Laboratoire de Sécurité des Aliments ;

² ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*.

- un rapport initial réalisé par un expert du CES ERCA sur l'influence de la congélation des produits entiers puis de la décongélation avant éviscération sur la répartition des toxines ASP dans l'animal entier.

Le présent avis a été réalisé dans le respect de la norme NF X 50-110 « qualité en expertise » et a été validé par le CES ERCA le 19 juin 2013.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES ERCA

QUESTION 1 : Eléments de réponse à la question portant sur les possibilités et limites d'un recours à des tests rapides

1 - Concernant l'existence des tests rapides et leur disponibilité

Au-delà des performances techniques classiques (spécificité, fidélité, linéarité...) et, afin de satisfaire aux besoins des autorités de contrôle, les tests rapides pour le dosage des toxines ASP doivent répondre à deux critères essentiels :

- une limite de quantification inférieure au seuil réglementaire de 4,6 mg kg⁻¹ pour permettre l'application de la décision 2002/226/CE ;
- une validation selon un protocole reconnu sur le plan international.

Les tests ELISA (tests immuno-enzymatiques)

Le test ELISA BIOSENSE AOAC 2006.02 est officiellement reconnu comme une méthode rapide alternative à la méthode de référence HPLC-UV³. Le règlement CE 1244/2007 précise qu'à « des fins de dépistage, la méthode 2006.02 ASP ELISA pour laquelle un kit est commercialisé en France, telle que publiée dans le Journal of AOAC International en juin 2006⁴, peut également être utilisée pour déterminer la teneur totale en ASP des parties comestibles de mollusques. En cas de contestation des résultats, la méthode de référence est la méthode HPLC. »

Ce test ELISA a été validé par un protocole reconnu au niveau international (Kleivdal *et al.*, 2007) par l'AOAC et constitue actuellement le seul test rapide à répondre aux exigences de la réglementation. Il est commercialisé en France.

Le tableau ci-dessous présente une comparaison des performances du kit ELISA AOAC OMA 2006.02 et de la méthode de référence basée sur une chromatographie liquide haute performance avec une détection par ultra-violet (HPLC-UV).

³ HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance avec détection par ultra-violet.

⁴ Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL (2006) 19th Ed., AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD USA, Official Method 2006.02.

	Méthode de référence HPLC-UV <i>sans étape de purification</i> (1)	ELISA AOAC OMA 2006.02
Temps de réalisation du test	10,5 h	2,5 h
sans l'étape de préparation et d'extraction des échantillons, équivalente quelle que soit la méthode	(en comptant l'étape d'injection de 9,5h pour une série de 6 échantillons environ)	
Limite de détection	1,0 mg kg ⁻¹	0,003 mg kg ⁻¹
Limite de quantification	3,0 mg kg ⁻¹	0,01 mg kg ⁻¹
CV ⁵ de répétabilité	1,2 à 8%	15 ± 4%
CV de reproductibilité	8 à 23%	23 ± 6%
Rendement	81 à 118 %	104 ± 10%

(1) (sans étape de purification sur cartouche pour une série de 6 échantillons avec un contrôle d'analyse négatif et un contrôle d'analyse positif)

Tableau 1 : Performances analytiques du kit ELISA AOAC OMA 2006.02 et de la méthode de référence HPLC-UV

Le protocole d'extraction appliqué à l'échantillon est identique pour les 2 méthodes, ce qui permet d'utiliser l'extrait indifféremment pour le test ELISA ou l'HPLC-UV.

Dans le cadre des essais inter-laboratoires d'aptitude organisés annuellement par le LR-UE⁶, un état membre a régulièrement utilisé le test ELISA AOAC OMA 2006.02 depuis 2008 et un autre état membre en 2011. Les performances de cette méthode sont généralement satisfaisantes (z-score inférieur à 2 pour 9 résultats sur 13). A noter un résultat faux-négatif vraisemblablement attribuable à une erreur de mise en œuvre du test.

Compte tenu de sa limite de quantification de 0,01 mg kg⁻¹, ce test 2006.02 permet largement de quantifier :

- le seuil de 4,6 mg kg⁻¹ valable pour les parties destinées à la consommation et en-dessous duquel les coquilles St. Jacques peuvent être soumises à la filière d'éviscération⁷
- le seuil réglementaire de 20 mg kg⁻¹ pour les produits commercialisables.

Il est néanmoins nécessaire de préciser que du fait de la nature de ce test, un risque de surestimation (dû à la réactivité de molécules analogues ou aux effets matrices) existe.

D'autres tests ELISA existent et sont également commercialisés. Mais contrairement à la méthode ELISA AOAC OMA 2006.02, ceux-ci ne sont pas validés selon un protocole internationalement reconnu. L'intérêt qu'ils présentent par rapport à la méthode ELISA précitée porte uniquement sur la praticité du test et l'aspect économique; en effet, le kit correspondant à la méthode AOAC 2006.02 et actuellement commercialisé en France est présenté en barrette sécable de 12 puits tandis que les kits ELISA permettent d'avoir un

⁵ CV : coefficient de variation

⁶ LR-UE : Laboratoire de référence de l'union européenne

⁷ L'éviscération consiste à enlever la glande digestive, les tissus mous (manteau) ou de toute autre partie contaminée.

nombre de puits moins important par barrette et donc d'être utilisé pour un nombre limité d'échantillons.

Autres tests rapides

Parmi les autres tests rapides commercialement disponibles, il existe sur le marché deux tests qualitatifs fondés sur le principe de l'immunochromatographie en flux latéral :

- un kit dont les informations disponibles indiquent qu'il permet de détecter l'AD lorsque celui-ci est présent à une quantité supérieure à 10 mg kg^{-1} (soit la moitié du seuil réglementaire).
Il est à noter que ce kit avait été utilisé par un état membre lors de l'EILA⁸ organisé par le LR-UE en 2007 avec des résultats cohérents (négatif pour l'échantillon dont la teneur en toxines était inférieure à 10 mg kg^{-1} et positif pour l'échantillon contenant des toxines à un niveau supérieur au seuil indiquant que la quantité d'AD est supérieure à 10 mg kg^{-1}).
- un autre kit qui, selon les informations disponibles, donne une réponse vis-à-vis du seuil réglementaire d'AD de 20 mg kg^{-1} .

Aucun de ces tests n'a été validé selon un protocole internationalement reconnu. A notre connaissance, aucun état membre ne l'utilise dans le cadre des contrôles officiels. Par ailleurs, de par leur seuil de réponse (10 ou 20 mg kg^{-1}), ces tests ne permettent pas de répondre à l'ensemble des prescriptions de la décision N° 2002/226/CE.

2 - Concernant l'utilisation possible de ces tests pour les contrôles officiels, si besoin en les utilisant en premier recours pour un screening avec confirmation et détermination des concentrations des échantillons positifs

De par la reconnaissance réglementaire du test ELISA AOAC OMA 2006.02 (voir ci-dessus), celui-ci pourrait donc être, sur le principe, utilisé en tant que méthode de screening dans le cadre des contrôles officiels à condition que le laboratoire dispose d'un savoir-faire pour appliquer des méthodes ELISA et d'un lecteur de microplaques avec détecteur UV (matériel courant en laboratoire).

Le LNR n'a pas participé à la validation inter-laboratoires de ce test et ne l'a pas caractérisé en interne à ce jour compte tenu du dispositif actuel, fondé sur l'analyse des coquillages par la méthode chimique HPLC-UV.

Il serait donc nécessaire de mener une étude plus spécifique pour connaître la réponse de ce test et évaluer quel pourrait être son utilisation dans le cadre des contrôles officiels.

Les autres kits présentés ci-dessus n'ayant pas été validés par un processus de validation inter-laboratoires internationalement reconnu, ni caractérisés par le LNR, leur utilisation dans le cadre des contrôles officiels n'apparaît pas adaptée.

Une étude menée au LNR, dont les contours devront être discutés avec les différentes parties prenantes, pourrait être envisagée si le besoin de faire évoluer le dispositif de surveillance est identifié par les autorités compétentes.

⁸ EILA : Essais interlaboratoires d'aptitude

QUESTION 2 : Eléments de réponse à la question portant sur l'influence de la congélation des coquilles St. Jacques entières puis de leur décongélation avant éviscération sur la répartition des toxines ASP dans les différents organes

1 - Rappel de l'avis Afssa 2008

En 2008, l'Afssa a publié un avis relatif à la maîtrise du risque phycotoxinique dans les pectinidés par la mise en place d'une filière d'éviscération (Afssa, 2008). La question de l'existence d'un risque supplémentaire lié à la congélation de coquillages pêchés dans l'attente de leur traitement par éviscération (transfert de toxines dans la chair, éclatement de la glande digestive lors de la congélation...) a été posée.

Cet avis note l'absence de données bibliographiques, sauf celles de Smith *et al.* (2006) qui ont travaillé spécifiquement sur des coquilles St. Jacques (*Pecten maximus*) entières fraîches (*jamais congelées*) et les toxines ASP. Ces derniers mettent en évidence une augmentation de la teneur en toxines ASP avec la température de conservation (5°C et 12°C) pendant 2 à 3 jours. Les auteurs supposent que la perte d'eau (séchage relatif) permet la concentration des toxines dans les organes contaminés en particulier le corail. Une éventuelle contamination du corail par du liquide intervalvaire⁹ n'est pas évoquée dans les hypothèses explicatives. L'Afssa a alors considéré que le phénomène de sublimation conduisant à une perte d'eau suite à la décongélation lente ou à température « élevée » des coquillages pourrait être à l'origine d'une part d'une augmentation de la teneur en AD dans les coquillages et d'autre part d'une possible diminution de son extractibilité (l'AD étant alors plus fortement lié à la matrice).

L'Afssa avait également conclu qu'il était « concevable que durant la congélation, la structure des tissus fortement contaminés en toxines soit altérée et que par conséquent, le déplacement d'eau lié à la fonte des cristaux lors de la décongélation soit susceptible d'entraîner une migration des toxines vers les tissus voisins. L'importance de ce phénomène sera fonction des niveaux de contamination et probablement de la nature des toxines (liposolubles ou hydrosolubles) ainsi que de leur « degré » de fixation au niveau de la matrice (biodisponibilité) ». La réalisation de travaux visant à étudier ces phénomènes afin de disposer de données expérimentales était encouragée.

Par ailleurs, l'Afssa avait décrit précisément le phénomène de formation des cristaux de glaces et les modifications structurelles de la chair que cela pouvait engendrer (par cisaillement). La cinétique de la congélation et de la décongélation est un facteur déterminant de la taille des cristaux formés et donc des altérations observées sur la matrice. Ainsi, plus une congélation est rapide, moins les cristaux de glace formés sont de taille importante et moins la matrice est déstructurée. De la même façon, une décongélation rapide entraîne un volume d'eau éliminé par exsudation plus important.

D'autres données expérimentales indiquent que l'AD est thermorésistant (et donc non éliminable par la cuisson) et très stable lors de la congélation des coquillages (Vale *et al.*, 2002 et McCarron *et al.*, 2007). Cela concorde avec la non biodégradabilité enzymatique rapportée par Lassus *et al.* (2007).

Pour limiter le risque lié à la possible contamination croisée entre organes et au phénomène de concentration des toxines suite à la sublimation, l'Afssa recommandait :

- une congélation rapide des coquillages (moins destructurante);

⁹ Le liquide intervalvaire correspond au liquide présent entre les deux valves du bivalve.

- une température constante de conservation des coquillages (pas de rupture de la chaîne du froid) ;
- emballage individuel des coquillages pour limiter tout risque de contamination croisée et pour éviter le phénomène de sublimation.

2 - Analyse bibliographique complémentaire portant sur l'influence de la congélation/décongélation sur la répartition des toxines ASP dans la coquille St. Jacques entière

Un travail bibliographique a été réalisé pour actualiser et élargir cette première expertise de 2008 en se basant sur des études expérimentales s'intéressant aux toxines paralysantes (PSP) et amnésiantes (ASP) ces deux familles étant constituées de molécules hydrophiles de faible masse moléculaire pour lesquelles on peut supposer un comportement physicochimique semblable. En effet, le nombre de travaux est limité et la plupart d'entre eux utilisent des protocoles expérimentaux variés et un faible nombre d'échantillons. Il est donc nécessaire d'examiner de manière large les cohérences de ces données bibliographiques.

Description des données tissulaires

Les données de contamination indiquent que les organes les plus contaminés sont, par ordre décroissant, la glande digestive (teneurs élevées), le corail et la noix (Frémy et Lassus, 2001).

Le corail est traversé par une anse intestinale (Smith *et al.*, 2006) ce qui peut expliquer, en plus d'une structure non musculaire, une teneur plus élevée en toxines que celle observée dans les noix (dépourvues de contact interne avec la glande digestive). Sur le plan anatomique, la glande digestive, masse noirâtre rarement consommée (sauf pour faire des sauces) et potentiellement fortement contaminée, est très proche des noix et du corail, parties consommées. L'éviscération a pour but l'élimination des tissus potentiellement fortement contaminés et physiquement proches des noix et du corail.

Kawashima et Yamanaka (1995) montrent que si la congélation des noix en conditions optimales (-70°C pendant 1 jour ou 1 mois) n'affecte pratiquement pas les structures initiales, la décongélation, par contre, entraîne des modifications biochimiques importantes. Durant l'entreposage réfrigéré après décongélation les changements *post mortem* des produits métaboliques sont beaucoup plus importants que ceux observés lors de l'entreposage réfrigéré des noix non congelées. Ces modifications sont moins importantes dans la noix décongelée rapidement que dans la noix décongelée de manière lente. La congélation rapide /décongélation rapide des noix de coquilles St. Jacques est donc moins destructurante qu'en mode lent. La congélation/décongélation agit sur le métabolisme tissulaire avec activation de la glycolyse et acidification par l'acide lactique, ce qui entraîne une baisse de la qualité gustative. Par ailleurs, les opérations de congélation/décongélation entraînent un éclatement des systèmes cellulaires et des cellules. Outre une baisse de la qualité, les opérations de congélation/décongélation de coquilles St. Jacques entières ont donc un effet destructurant des tissus proches, plus ou moins intense en fonction de divers facteurs dont le contrôle sera sous la responsabilité de la filière concernée.

Conséquences en termes de répartition des toxines suite à un cycle congélation/décongélation

Certains auteurs ont constaté des répartitions inhabituelles de toxines entre les différents organes de coquilles St. Jacques traitées selon des modalités de conservation différentes :

- Reboreda *et al.* (2010) ont étudié la décroissance du contenu en phycotoxines chez les bivalves en fonction de divers procédés industriels et ont observé la contamination en AD du liquide intervalvaire des coquilles St. Jacques décongelées rapidement. La concentration en AD est plus importante dans les coquilles St Jacques décongelées avant élimination du liquide intervalvaire.
- Frémy *et al.* (1993) ont mesuré, dans certains cas, des niveaux de contamination en toxines paralysantes (autre famille de toxines hydrosolubles) très proches entre le corail et les noix conservés ensemble dans des emballages de 1 kilogramme. La contamination des noix en l'absence de contamination du corail n'ayant jamais été observée sur des coquillages frais, un transfert *post mortem* est donc supposé pour ce type de toxines hydrosolubles.
- Dans le cadre des expérimentations de Lassus *et al.* (2007) qui ont porté sur la détoxification à l'échelle industrielle des coquillages contaminés par les phycotoxines, entre autres résultats rapportés, on note qu'une contamination artificielle en AD des coquilles St Jacques a pu être obtenue par l'application pendant seulement 10 min d'un homogénat de glandes digestives sur le corail. Cette observation permet de supposer que la formation d'un liquide intervalvaire contaminé suite à une décongélation rapide comme signalé par Reboreda *et al.* (2010) s'accompagnerait d'un transfert de contamination (en fonction du temps de contact) du liquide intervalvaire vers des organes moins contaminés. Cette extrapolation serait aussi valable pour un transfert des toxines par contact direct entre organes.

En conclusion, le liquide intervalvaire se contamine en toxines après congélation/décongélation. Il n'est pas possible d'exclure l'hypothèse que surviennent, lors de la congélation/décongélation des coquilles St. Jacques entières, des transferts indirects de toxines ASP entre organes *via* le liquide intervalvaire et selon le temps de contact. Les transferts directs sont aussi possibles entre tissus proches puisque la déstructuration de ces tissus est confirmée après décongélation.

3 - Analyse bibliographique portant sur l'efficacité des traitements de détoxification des coquilles St. Jacques en toxines ASP

Bien que non demandée par la DGAI, cette analyse constitue un prolongement logique de la question initiale. L'analyse bibliographique révèle en effet plusieurs moyens pour diminuer le niveau de contamination en toxines hydrophiles des coquillages.

- Lassus *et al.* (2007) ont observé que le lavage à l'eau du robinet du corail de coquilles St Jacques fraîches naturellement contaminées en AD à une valeur proche du seuil réglementaire (de 20 mg kg⁻¹) pendant 15 min réduit fortement le taux d'AD en dessous du seuil réglementaire et à un niveau non détectable après 120 min. En contaminant expérimentalement le corail (jusqu'à 160 mg kg⁻¹) c'est-à-dire en les faisant tremper 10 min dans une solution d'homogénat de glande digestive, un lavage à l'eau pendant 45 min a permis de diminuer le niveau de contamination du corail en dessous du seuil réglementaire.

En ce qui concerne les noix de coquilles St. Jacques fraîches, les mêmes auteurs indiquent qu'en général (avec des niveaux de contamination faibles pour le corail et les noix sans plus de précision) un lavage à l'eau de 5 min des coquillages permettrait d'atteindre des niveaux de décontamination acceptables. Ces résultats sur des coquilles St. Jacques fraîches ne permettent toutefois pas de conclure sur l'efficacité d'un lavage à l'eau de 5 min dans le cas d'une contamination au-delà du seuil réglementaire et à la suite d'un cycle de congélation/décongélation. Néanmoins cela indique que l'eau est un bon véhicule pour les transferts des toxines hydrosolubles comme l'AD. Cela explique notamment le rôle de l'eau lors de la contamination du liquide intervalvaire après congélation/décongélation ou lors de la décontamination après des opérations de lavage.

- Rebores et al. (2010) ont étudié plusieurs procédés de détoxification en toxines sur des bivalves frais et décongelés. Parmi ceux-ci, ces auteurs ont comparé 3 procédés pour l'étude spécifique de l'ASP à savoir un « traitement thermique » (ou thermal process)¹⁰ (du même type que celui ayant mené à la décision 96/77/EC¹¹ pour *Acanthocardia tuberculatum* L. porteuse de toxines hydrosolubles PSP), le traitement par éviscération et la congélation/décongélation :
 - (i) Sur des coquilles St. Jacques contaminées à 125 mg kg⁻¹ (ayant subi une congélation/décongélation) la seule élimination du liquide intervalvaire et de l'eau de décongélation produit par une décongélation rapide ne suffit pas à atteindre le seuil réglementaire de 20 mg kg⁻¹ les teneurs en AD de l'animal entier, qui diminuent alors seulement de 87 à 44 mg kg⁻¹. L'élimination du liquide intervalvaire et du liquide de décongélation qui se rajoute pourrait être une solution de décontamination si aucun lavage n'était fait ensuite, mais resterait insuffisante sur des coquilles St Jacques fortement contaminées.
 - (ii) L'ablation de la glande digestive sur coquillage frais (c'est-à-dire avant toute éventuelle congélation) contaminé à 112 mg kg⁻¹ est efficace ramenant le niveau de contamination de l'animal entier à 1,98 mg kg⁻¹ (pour un seuil réglementaire fixé à 20 mg kg⁻¹). Par contre, sur ces mêmes coquillages, le « traitement thermique » ou la congélation/décongélation appliqués seuls ne permettent pas d'atteindre des niveaux inférieurs au seuil réglementaire. L'utilisation du « traitement thermique » (étant donné la stabilité des phycotoxines ASP aux températures élevées, l'efficacité de décontamination du « traitement thermique » pourrait s'expliquer essentiellement par les lavages successifs qu'il comprend) suivie de l'ablation de la glande digestive a également été testée et se révèle être efficace puisqu'elle entraîne une diminution des teneurs jusqu'à 1,63 mg kg⁻¹. Cependant, les auteurs précisent que sur des coquilles St. Jacques entières congelées, la décongélation suivie d'une simple éviscération permet de diminuer la concentration en AD à des niveaux inférieurs (non précisés) mais encore proches du seuil réglementaire.

¹⁰ Le traitement est fait sur le mollusque entier avec lavage et pré-cuisson (95°C , 3 min) juste avant séparation des coquilles des chairs totales (écoquillage simple) puis re-lavage et cuisson (98°C , 9 min), refroidissement puis séparation sous pression d'eau pour récupération des seules chairs comestible (le pied) et autoclavage à 116°C , 51 min au moins.

¹¹ 96/77/CE: Décision de la Commission, du 18 janvier 1996, établissant les conditions de récolte et de transformation de certains mollusques bivalves provenant de zones où les niveaux de toxines paralysantes dépassent la limite fixée par la directive 91/492/CEE du Conseil (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE). Official Journal of European Communities 15, 46–47.

- (iii) Enfin, la combinaison d'une congélation/décongélation suivie par une ablation de la glande digestive et d'un « traitement thermique » permet d'atteindre des niveaux de 1,6 mg kg⁻¹.

Dans le cadre du présent avis, le cycle décongélation associé à une éviscération puis complété par un « traitement thermique » est la méthode la plus efficace pour traiter des coquilles St. Jacques entières congelées, selon Reborada et al. (2010). Cependant, ce « traitement thermique » (associant lavages, chauffages et stérilisation) conduirait à produire des coquilles St. Jacques transformées (cuites et stérilisées) de qualité nutritionnelle réduite et reste certainement peu adapté aux besoins de la filière concernée.

Ces expérimentations utilisant un matériel biologique contaminé seulement à hauteur de 125 mg kg⁻¹, comparé au seuil maximal autorisé par la réglementation pour la filière spécifique d'éviscération des coquilles St. Jacques de 250 mg kg⁻¹ (conformément à la décision 2002/226/CE) les niveaux de contamination observés à l'issue des différents traitements rapportés ci-dessus pourraient donc être supérieurs avec des coquillages contaminés jusqu'à 250 mg kg⁻¹.

Tous ces résultats demandent à être confirmés par une étude spécifique puisqu'ils émanent d'études dont les essais ont porté sur un faible nombre de coquillages contaminés à des teneurs en dessous du seuil maximal autorisé de 250 mg kg⁻¹ et à partir d'extraits eau-méthanol pour lesquels la stabilité des toxines ASP n'est pas optimale (Smith et al., 2006).

Il conviendrait donc de vérifier par des techniques appropriées si, à partir de coquilles St. Jacques contaminées aux valeurs maximales autorisées de 250 mg kg⁻¹, l'application des traitements suivants permet d'atteindre des valeurs inférieures au seuil réglementaire de 20 mg kg⁻¹ (décision N° 2002/226/CE) dans les parties comestibles (principalement corail et noix) et/ou à celui de 4,6 mg kg⁻¹ (qui est l'une des conditions nécessaires avant éviscération) :

- **Traitement 1 : congélation, décongélation rapide, isolement des seules noix et lavage à l'eau du robinet pendant 5 min ;**
- **Traitement 2 : congélation, décongélation rapide, isolement des noix et du corail et lavage à l'eau du robinet pendant 5 min ;**
- **Traitement 3 : congélation, décongélation rapide et isolement des noix et du corail et « traitement thermique ».**

CONCLUSIONS DU CES ERCA

Le CES ERCA rappelle que l'éviscération sur coquillage frais reste la meilleure solution en termes de décontamination.

Concernant l'influence de la congélation des produits entiers puis de la décongélation avant éviscération sur la répartition des toxines ASP dans l'animal entier, le CES considère que :

- la congélation/décongélation conduit à une déstructuration des tissus qui peut provoquer une modification de la répartition tissulaire des toxines ASP via le liquide intervalvaire ou par contact tissulaire direct. Si elles sont faites rapidement, la congélation à -20°C et la décongélation en dessous de 2°C sont moins déstructurantes, et sont donc à privilégier ;
- une simple éviscération sur des coquilles St. Jacques décongelées peut être insuffisante pour décontaminer en deçà de 20 mg kg^{-1} les parties comestibles des toxines ASP en fonction du niveau de contamination initial ;
- l'adjonction d'autres traitements (simple lavage à l'eau du robinet ou « traitement thermique » tel que décrit dans la décision 96/77/CE) peut être efficace en termes de décontamination des coquilles St. Jacques décongelées, mais ce point devrait être confirmé par la mise en place d'un protocole expérimental spécifique, compte tenu des limites méthodologiques des études déjà identifiées. Leur applicabilité par la filière devra également être prise en compte.

Le CES rappelle que la réglementation N°2002/226/CE ne précise pas si les dispositions spécifiques applicables aux coquilles St. Jacques avant leur éviscération (notamment le seuil de $4,6\text{ mg/kg}$ pour les parties comestibles) concernent uniquement des coquillages frais. Cet aspect est d'autant plus important que l'impact de la congélation/décongélation sur la répartition tissulaire des toxines peut conduire à des teneurs en AD supérieures à $4,6\text{ mg/kg}$ dans les parties comestibles en sortie de filière.

Concernant l'existence de tests de dosage rapide des toxines ASP dans les coquilles St. Jacques et leur utilisation dans le cadre des contrôles officiels, le CES conclut que :

- Les principaux critères de validité à respecter pour ce test sont :
 - o une limite de détection inférieure au seuil réglementaire de $4,6\text{ mg kg}^{-1}$
 - o une validation selon un protocole reconnu sur le plan international.
- Le test ELISA AOAC OMA 2006.02, cité dans le règlement 1244/2007 semble satisfaire ces critères, mais une confirmation de ses performances par le LNR sera nécessaire ainsi qu'une évaluation de son utilisation dans le cadre des contrôles officiels.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail adopte les conclusions du CES ERCA.

MOTS-CLES

Toxines amnésiantes, acide domoïque, coquilles St. Jacques, congélation, décontamination, méthode d'analyse

BIBLIOGRAPHIE

ANSES – avis relatif à la maîtrise du risque phycotoxinique dans les pectinidés par la mise en place d'une filière d'éviscération. 14 novembre 2008.

Fremy JM, Ledoux M, Bilodeau M, Major M, Murail I, Jamet J (1993). Variation de la contamination par les phycotoxines paralysantes de coquilles Saint-Jacques importées d'Asie. *Sciences des aliments* n°13, 751-759

Frémy JM et Lassus P (2001). « *Toxines d'algues dans l'alimentation* », Chapitre 12. Contamination, transformation et détoxification des produits marins, P Lassus, C Marcaillou p 403 à 446. Ed. *Ifremer-AFSSA*, 552 pp.

Kawashima K, Yamanaka H (1995). Effets de la congélation et de la décongélation sur les modification biochimiques post – mortem de la noix de coquilles Saint-Jacques. *Fisheries Science*, Vol 61 (4), 691-695

Kleivdal, H., Kristiansen, S.I., Nilsen, M.V., Goksøyr, A., Briggs, L., McNabb, P. and Holland, P. (2007) Determination of Domoic acid Toxins in Shellfish by Biosense ASP ELISA - A direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay: Collaborative study. *J.AOAC Int.* 90 (4):1011-1027

Lassus P., Gowland D., McKenzie D., Kelly M., Braaten B., Marcaillou-M.C., Blanco J. (2007). Industrial scale detoxification of phycotoxin-contaminated shellfish: myth or reality? proceedings 6th International Conference Molluscan Shellfish safety, Benheim, NZ, March 2007. The royal Society of New Zealand, Miscellaneous ser., 71, 289-297

McCarron P., Burrell S., Hess P. (2007). Effect of addition of antibiotics and an antioxidant on the stability of tissue reference materials for domoic acid, the amnesic shellfish poison. *Anal Bioanal Chem*, 387, pp 2495-2502

Reboreda A, Lago J, Chapela MJ, Vieites JM, Botana LM, Alfonso A, Cabado AG (2010). Decrease of marine toxin content in bivalves by industrial processes. *Toxicon*, 55, 235-243.

Smith EA, Papapanagiotou EP, Brown NA, Stobo LA, Gallacher S, Shanks AM (2006). Effects of storage on amnesic shellfish poisoning (ASP) toxins in king scallops (*Pecten maximus*). *Harmful Algae*, 5(1), 9-19.

Vale, P. and de M. Sampayo M.A. (2002). Evaluation of extraction methods for analysis of domoic acid in naturally contaminated shellfish from Portugal. *Harmful Algae* 1, pp 127-135.