



Focus sur un laboratoire

Laboratoire de référence de l'Union européenne pour le contrôle des biotoxines marines

M. L. Rodríguez-Velasco, Laboratoire de référence de l'Union européenne pour le contrôle des biotoxines marines, Agencia Española Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), Estación Marítima s/n, 36200 Vigo, Espagne, crlmb@msps.es

Rodríguez-Velasco M. L. (2010). Laboratoire de référence de l'Union européenne pour le contrôle des biotoxines marines, EuroReference, n° 3, ER03-10F01. <http://www.afssa.fr/euroreference/numero3/PN4001.htm>



Le laboratoire des biotoxines marines situé à Vigo, qui relève du ministère espagnol de la Santé, est depuis 1993 le laboratoire de référence européen pour le contrôle des biotoxines marines et il est aujourd'hui l'un des laboratoires de l'Agence espagnole pour la sécurité alimentaire et la nutrition (AESAN). Dans le cadre de sa mission de développement des fonctions de laboratoire de référence de l'Union européenne (UE), il dirige les efforts d'harmonisation des méthodes analytiques dans le domaine des biotoxines marines. Il soutient également différentes initiatives visant à introduire de nouvelles méthodes analytiques dont le développement est urgent et qui sont mieux adaptées aux connaissances de pointe actuelles. Le personnel du laboratoire de référence de l'UE constitue un groupe pluridisciplinaire qui comprend des chercheurs ayant une formation en biologie, en immunochimie et en chimie analytique, recevant le soutien d'experts de l'AESAN et d'universitaires.

Les biotoxines marines (BM) sont essentiellement produites par certaines espèces de phytoplanctons et peuvent s'accumuler dans les tissus des mollusques filtrants à coquille tels que les moules, les huîtres, les coques, les palourdes et les coquilles Saint-Jacques. La consommation de coquillages contaminés peut entraîner des dangers pour la santé humaine. Les maladies liées aux biotoxines marines se manifestent par des symptômes tels que des maux de tête, des vomissements, des diarrhées et des problèmes neurologiques, et, dans des cas extrêmes, peuvent entraîner la mort.

Les premières réglementations européennes relatives aux BM ont été introduites au début des années 1990, et ont été étendues à des groupes de toxines supplémentaires en 2002. Le *Paquet Hygiène de l'UE* a ensuite réuni et remplacé les réglementations précédentes. Ainsi, l'annexe III, section VII, chapitre V, point 2, du règlement (CE) n° 853/2004 fixe les quantités limites de toxines ASP (acide domoïque), de toxines PSP (groupe des saxitoxines) et de trois groupes de toxines marines lipophiles : les toxines DSP (comprenant le groupe de l'acide okadaïque et le groupe des pecténotoxines), le groupe des azaspiracides et le groupe des yessotoxines. Le règlement (CE) n° 854/2004 requiert que les autorités compétentes des États membres de l'UE vérifient les mollusques bivalves vivants en ce qui concerne la présence de biotoxines marines avant leur mise sur le marché.

L'annexe III du règlement (CE) n° 2074/2005 de la Commission établit ainsi les méthodes d'analyse de référence à appliquer pour le contrôle officiel des BM, y compris les méthodes chimiques (pour les toxines ASP) et les méthodes biologiques (bio-essai sur souris et sur rat), dans le cas des toxines PSP et des toxines lipophiles.

De plus, afin d'établir un système de surveillance efficace pour détecter les biotoxines marines, une décision du Conseil en 1993 stipule que chaque État membre doit désigner un laboratoire national de référence (LNR) pour coordonner les analyses nécessaires. Aussi, afin d'assurer un système normalisé à travers l'UE, un Laboratoire de référence de l'Union européenne a été mis en place pour coordonner le réseau européen des LNR

(LNR-UE). C'est à ce moment que le laboratoire du « *Ministerio de Sanidad y Consumo* » situé à Vigo (Espagne) fut désigné comme le laboratoire de référence de l'Union européenne pour le contrôle des biotoxines marines. Depuis 2005, il fait partie de l'Agence espagnole pour la sécurité alimentaire et la nutrition (AESAN) sous l'égide du ministère espagnol de la Santé et de la Politique sociale.

Une partie des règlements du *Paquet Hygiène de l'UE*, l'article 32 du règlement (CE) n° 882/2004, harmonise les devoirs et les obligations que les laboratoires de référence de l'UE pour les denrées alimentaires et les aliments pour animaux doivent remplir dans le cadre de leur mission. Ainsi, le laboratoire de référence doit disposer d'un personnel suffisamment qualifié ainsi que des équipements, des réactifs et d'une infrastructure administrative appropriée. En outre, il doit veiller à ce que son personnel respecte le caractère confidentiel de certains sujets, résultats et communications et qu'il ait une connaissance suffisante des normes et des pratiques internationales. Une liste des substances de référence disponibles et de leurs fournisseurs doit être maintenue à jour. Le laboratoire doit aussi prendre en compte les travaux de recherche menés à l'échelle nationale et communautaire et disposer d'un personnel formé pour les situations d'urgence survenant dans l'Union.

Le présent article décrit la façon dont le laboratoire de Vigo remplit ses missions de référence. En particulier, depuis les changements structurels et fonctionnels qui ont suivi l'intégration à l'AESAN en 2005 (incorporation de personnel supplémentaire, meilleures infrastructures et meilleurs équipements), les activités du laboratoire ont été concentrées principalement sur le remplacement des essais biologiques comme méthode de référence pour certains groupes de biotoxines marines. En effet, plusieurs parties prenantes (autorités de réglementation, organisations de défense du bien-être animal, organisations scientifiques, etc.) ont exprimé leur inquiétude face à l'utilisation de telles méthodes, non seulement en raison du nombre important d'animaux soumis à des procédures causant une douleur et une souffrance importantes, mais aussi à cause des arguments de la communauté scientifique selon lesquels



Focus sur un laboratoire

les essais sur animaux ne seraient pas appropriés pour toutes les classes de toxines et que les méthodes scientifiques de pointe pour la détection et l'identification des BM ne seraient pas complètement appliquées dans la pratique courante. Dans cet article, différentes initiatives conduites par le laboratoire de référence de l'UE pour le contrôle des biotoxines marines seront présentées et discutées en examinant en particulier le défi scientifique qu'elles soulèvent, en raison de l'absence de standards pour la plupart des toxines et de la difficulté à obtenir des méthodes validées entre laboratoires qui peuvent être reconnues par la législation comme remplacement des essais sur animal pour le contrôle des BM dans les mollusques tout en assurant le même niveau de protection de la santé publique.

Coordination des activités du réseau des LNR-UE et apport d'assistance technique et de formation

En plus d'une communication permanente par des moyens électroniques, les LNR-UE du réseau interagissent lors des réunions générales annuelles auxquelles les LNR sont invités. Ces réunions, habituellement organisées au sein d'un LNR différent chaque année, offrent un forum de discussion et d'accord sur les méthodes d'analyse, les critères de réalisation et diverses questions liées au contrôle et à la gestion des BM. Elles sont l'occasion de présenter les activités annuelles du réseau des LNR-UE, de soulever des questions pertinentes relatives aux biotoxines marines dans chaque État membre, de discuter des résultats des essais inter-laboratoires d'aptitude et des initiatives liées aux activités futures du réseau. Différents groupes de travail (GT) sur des sujets spécifiques ont été mis en place dans le cadre de la Commission européenne et comprennent des experts du réseau des LNR-UE ainsi que des experts externes au réseau. Les GT abordent différents problèmes :

- le GT sur la détermination des toxines lipophiles par bio-essai a travaillé sur l'harmonisation des différents protocoles utilisés ;
- le GT sur la CL-SM (chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse), dont l'objectif est le développement et la validation d'une méthode de CL-SM pour la détermination des toxines lipophiles ;
- le GT sur la détermination des toxines PSP par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) s'est penché sur la mise en œuvre de la méthode alternative, « la méthode officielle de l'AOAC 2005.6 », pour le contrôle officiel des toxines PSP ;
- d'autres GT traitent de problèmes spécifiques sur requête de la Commission européenne, comme le GT sur la toxicologie qui a étudié les dernières informations toxicologiques disponibles concernant les toxines qui font actuellement l'objet de législations et aussi concernant les nouvelles toxines (imines cycliques, palytoxine).

Une autre mission du laboratoire de référence de l'UE est d'apporter une assistance technique aux États membres ou à des pays tiers lorsqu'ils demandent des informations sur les BM. Cela se traduit par une assistance individuelle soutenue. En outre, le site de l'AESAN, <http://www.aesan.msp.es/fr/CRLMB/web/home.shtml>, fournit des informations sur la législation relative aux toxines marines, les méthodes, les procès-verbaux et les recommandations des différentes réunions et toutes les activités liées au laboratoire de référence. Ces informations sont continuellement mises à jour.

Différentes activités sont menées en parallèle pour former le personnel des LNR ou de pays tiers dans des domaines liés aux BM, essentiellement en ce qui concerne les méthodes de détection et de dosage.

Conseil et soutien scientifiques

Le laboratoire de référence de l'UE pour le contrôle des biotoxines marines apporte une assistance technique à la Commission européenne, par l'intermédiaire de la Direction générale de la santé et des consommateurs (DG SANCO), sur demande. De ce fait, il assiste souvent l'Office alimentaire et vétérinaire (OAV) dans ses missions dans les pays tiers pour évaluer les systèmes en place en matière de contrôle des biotoxines marines. En outre, il est chargé d'intervenir lorsque les résultats d'analyse sont contestés entre États membres ou entre États membres et pays tiers. Pour remplir cette responsabilité, il agit à titre de laboratoire officiel et est accrédité en ce qui concerne les méthodes de référence de détermination des BM par l'autorité d'accréditation espagnole.

De plus, le personnel du laboratoire de référence de Vigo visite les laboratoires des États membres ou des pays tiers pour apporter un soutien technique ponctuel lorsque nécessaire.

Le laboratoire participe également aux différents GT scientifiques et techniques, apportant des conseils dans son domaine de compétence, et aux groupes de discussion de l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA), du *Codex Alimentarius* ou du Comité européen de normalisation (CEN), en tant que membre du Comité technique CEN/TC 275/WG5 « Biotoxins ».

Essai d'aptitude inter-laboratoires

Des tests d'aptitude (TA) sur les trois groupes de BM concernés par la législation (spécifiquement l'acide domoïque, le groupe de la saxitoxine et les toxines lipophiles) sont organisés chaque année dans le but d'évaluer la capacité des LNR-UE à appliquer de façon satisfaisante les méthodes d'analyse reconnues pour le contrôle des BM. En parallèle, l'équivalence des différentes méthodes utilisées est étudiée. L'organisation et l'évaluation statistique de ce système de TA sont accomplies selon des protocoles internationaux tels que l'ISO/IEC 17043, l'ISO 13528 ou le Protocole international harmonisé pour les essais d'aptitude de l'UICPA. Une action de suivi est également mise en œuvre lorsqu'un laboratoire échoue à un TA et le laboratoire de Vigo, le cas échéant, assiste les LNR-UE ayant des problèmes pour appliquer les méthodes de BM.

Développement de méthodes analytiques

Comme mentionné précédemment, le laboratoire a déployé des efforts supplémentaires ces dernières années pour trouver des méthodes alternatives validées en raison de la nécessité urgente de remplacer les méthodes de référence biologiques actuelles utilisant des animaux par d'autres essais des BM. La stratégie de remplacement est résumée dans la figure 1.



Focus sur un laboratoire

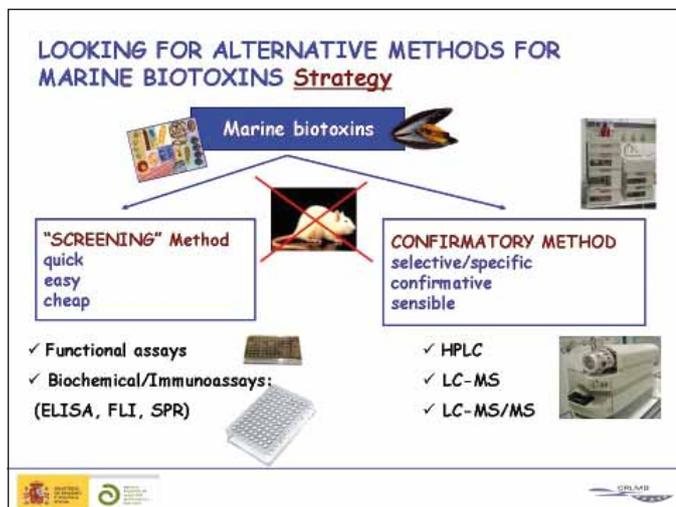


Figure 1. Stratégie pour obtenir des méthodes alternatives au bio-essai sur souris pour l'analyse des biotoxines marines.

La tâche n'est toutefois pas aisée en raison de limitations tant scientifiques qu'opératoires. Dans le premier groupe, la réalité est que la cible biologique ou le mécanisme d'action ne sont pas encore connus pour certaines toxines (par ex. les azaspiracides) ou encore que certaines BM entraînent une immunogénicité faible ou non spécifique, ce qui rend difficile le développement de méthodes fonctionnelles ou immunologiques. En revanche, la mise en œuvre de méthodes d'analyse de confirmation (basées sur les techniques d'HPLC et de CL-SM) nécessite que des facteurs d'équivalence toxique (FET) soient disponibles pour chaque toxine afin de pouvoir quantifier les équivalents de toxicité totale pour chaque groupe de BM. Spécifiquement, le point critique crucial est l'absence de normes pour la plupart des congénères de BM, limitant ainsi la recherche dans ce domaine aussi bien que la mise en œuvre de méthodes d'analyse. Par ailleurs, la difficulté du processus de validation (impliquant des matrices complexes et des toxines très différentes) doit également être prise en compte.

En tenant compte des objectifs et des limitations ci-dessus, le laboratoire de Vigo a coordonné différentes initiatives pour le développement, la mise en œuvre et la validation d'alternatives aux bio-essais. Certaines d'entre elles, dans le cadre des GT des laboratoires de référence/LNR-UE (méthode de CL-SM pour les toxines lipophiles, HPLC pour les toxines PSP), ont déjà été décrites. Il a participé à la validation d'une méthode fonctionnelle (basée sur un test d'inhibition de la phosphatase) pour la détermination des toxines du groupe de l'acide okadaïque, qui utilise un kit normalisé.

Il a également été impliqué dans deux projets européens, BioCop et DetecTox, visant à développer des tests rapides pour les toxines PSP et lipophiles basés respectivement sur des biosenseurs de résonance plasmonique de surface.

Références bibliographiques

Ben-Gigirey B, Rodríguez-Velasco ML, Villar-González A, Botana LM. 2007. Influence of the sample toxic profile on the suitability of a high performance liquid chromatography method for official paralytic shellfish toxins control. *J. Chromatography A*, 1140 (1-2): 78-87.

Règlement (CE) n° 2074/2005 de la Commission du 5 décembre 2005. *Journal officiel de l'Union européenne*, L338: 27-59.

FAO/IOC/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2004. Marine Biotoxins. FAO Food and Nutrition Paper 80. Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture, Rome, Italie. Disponible à l'adresse: <http://www.fao.org/docrep/007/y5486e/y5486e00.HTM>

Règlement (CE) n° 853/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004. *Journal officiel de l'Union européenne*, L139: 55-205.

Rodríguez-Velasco M, Ben-Gigirey B, Domínguez-Diéguez L. 2009. Progress in the implementation of the AOAC OMA 2005.06 for the official control of PSP toxins in molluscs: interlaboratory studies. Présentation d'affiche à la 123^e réunion annuelle de l'AOAC. Philadelphie (États-Unis), septembre 2009.

Rodríguez-Velasco M, Villar-González A, Domínguez-Diéguez L. 2009. Interlaboratory comparison on matrix effects for lipophilic toxins determination in molluscs by LC-MS/MS. Présentation d'affiche à la 123^e réunion annuelle de l'AOAC. Philadelphie (États-Unis), septembre 2009.

Rodríguez-Velasco ML. 2008. Toxin Monitoring Programs and Regulatory View. In *Seafood and Freshwater Toxins. Pharmacology, Physiology and Detection*, ch. 43, pp. 919-932. Botana Ed.

Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on Marine Biotoxins in Shellfish-Summary on regulated marine biotoxins. 2009. *The EFSA Journal*, 1306: 1-23.

EU Harmonised Standard Operating Procedure for detection of Lipophilic Toxins by Mouse Bioassay. Version 5.0, juin 2009. Disponible à l'adresse: http://www.aesan.msps.es/CRLMB/docs/docs/metodos_analiticos_de_desarrollo/EU-Harmonised-SOP-MBA-Lipophilic-Version5-June2009.pdf

EU Harmonised Standard Operating Procedure for determination of OA-group Toxins LC-MS/MS. Version 1, août 2009. Disponible à l'adresse: http://www.aesan.msps.es/CRLMB/docs/docs/metodos_analiticos_de_desarrollo/EU-Harmonised-SOP-LCMS-OA-Version1.pdf