

Maisons-Alfort, le 30 octobre 2002

## AVIS

### de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'évaluation des risques pour la santé publique liés à l'utilisation du vert malachite pour le traitement des maladies des poissons

LE DIRECTEUR GÉNÉRAL

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 25 mars 2002 par la Direction Générale de l'Alimentation d'une demande d'avis sur les risques pour la santé publique liés à l'utilisation du vert malachite pour le traitement des maladies des poissons, et pour proposer des seuils maximaux de résidus et des préconisations de conditions d'utilisation de ces substances afin de limiter les éventuels risques pour la santé publique.

Le 3 octobre 2002, la Direction Générale de la Santé a également saisi l'Afssa sur le statut du vert malachite au regard de la réglementation des médicaments vétérinaires.

#### CONTEXTE

Le vert malachite n'est pas une substance chimique bien définie, puisque ce nom est appliqué à toute substance contenant le N-[4-[[4-(diméthylamino)phénylméthylène]-2,5-cyclohexadien-1-ylidène]-N-méthylméthanaminium-cation. C'est un colorant organique de formule simplifiée  $C_{23}H_{25}N_2$  pour la forme ionisée et  $C_{23}H_{26}N_2O$  pour la forme non ionisée (carbinol ou pseudobase). Il est disponible sous forme de chlorhydrate ou d'oxalate de vert malachite.

Bien que vendu sous forme de matière première et sans revendication d'indications thérapeutiques, le vert malachite est utilisé en aquaculture dans le traitement de maladies fongiques et parasitaires. Actuellement, il n'entre dans la composition d'aucun médicament vétérinaire bénéficiant d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) et n'est pas inscrit sur les listes des substances vénéneuses.

Selon l'article 14 du règlement (CE) N° 2377/90 du Conseil du 26 juin 1990<sup>1</sup>, l'administration de médicaments vétérinaires concernant des substances pharmacologiquement actives qui ne figurent pas aux annexes I, II ou III à des animaux destinés à la production d'aliments est interdite dans la Communauté. Le vert malachite étant destiné au traitement de maladies fongiques et parasitaires en aquaculture, il rentre dans la définition du médicament vétérinaire.

Du fait de la situation réglementaire mal définie du vert malachite, son utilisation est difficilement contrôlable. La Direction Générale de l'Alimentation a préconisé une utilisation raisonnée de cette substance, la limitant aux œufs embryonnés et aux alevins de moins de 5 grammes en précisant que l'eau des bains ayant servi au traitement ne devait pas entrer

<sup>1</sup> Règlement (CE) n° 2377/90 du Conseil du 26 juin 1990, établissant une procédure communautaire pour la fixation des niveaux maximaux de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments d'origine animale. JOCE n° L224 du 18.08.1990, p. 1.

en contact avec les poissons d'un stade de développement supérieur<sup>2</sup>. Cette situation peu claire se retrouve dans différents pays qui ont parfois préconisé des recommandations d'utilisation à l'instar de la France ou de délai d'attente avant la mise sur le marché des poissons traités.

Dans le cadre de la directive 96/23/CE relative aux mesures de contrôle à mettre en œuvre à l'égard de certaines substances et de leurs résidus dans les animaux vivants et leurs produits, dont une rubrique concerne les colorants à laquelle appartient le vert malachite, les autorités françaises réalisent régulièrement des plans de contrôle du vert malachite dans les poissons d'aquaculture. Le seuil de positivité retenu est la limite de 10 µg/kg (seuil de référence en Allemagne).

#### **IMPLANTATION DES PISCICULTURES ET SYSTEMES D'ELEVAGE**

Les modes d'alimentation en eau sont variables : dérivation de cours d'eau, source, forage, pompage. Les piscicultures sont le plus souvent en circuit ouvert.

Cependant, il peut y avoir utilisation de circuits fermés, avec filtre biologique et stérilisation de l'eau aux UV, dans les premiers stades de production, de l'œuf à l'alevin de quelques grammes.

Pour les circuits ouverts, deux types d'installation existent :

- les bassins d'élevage sont implantés en continu : l'eau issue d'un premier bassin alimente un second bassin et ainsi de suite. Dans ce type d'élevage, les poissons les plus jeunes (alevins) sont mis en tête de pisciculture, endroit où la qualité de l'eau est la meilleure, puis suivent les autres stades de l'élevage, juvéniles, portion etc. Souvent les reproducteurs sont placés en dernière eau, en "queue de pisciculture" ;
- les bassins d'élevage sont implantés en parallèle : l'eau qui a alimenté un bassin est rejetée à la rivière et ne passe pas dans un autre bassin.

Après consultation du Comité d'experts spécialisé "Résidus et contaminants chimiques et physiques" réuni le 30 septembre 2002 et de l'Agence nationale du médicament vétérinaire, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments émet l'avis suivant.

#### **1 UTILISATION DU VERT MALACHITE**

L'activité du vert malachite a été démontrée depuis longtemps chez les poissons vis-à-vis des mycoses externes (saprolegniose), des ectoparasitoses, notamment les parasites ciliés comme *Ichthyophthirius* (responsable de la maladie des points blancs) et le *Trichodina*, et plus récemment d'une parasitose interne due à une myxosporidie responsable de l'hépatonéphrite parasitaire ou "Proliferative Kidney Disease (PKD)".

<sup>2</sup> Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, Direction Générale de l'Alimentation. Note de service du 19 janvier 2001 relative au bilan des plans de contrôle des résidus chimiques réalisés en 1999 en application de la directive 96/23/CEE.

Il est utilisé depuis de nombreuses années en traitement préventif sur les œufs fécondés de poisson à raison de 2 à 5 mg/L pendant 20 à 40 minutes, tous les 2 à 3 jours (tous les jours dans certains élevages), pendant toute la durée de l'incubation.

Il est également appliqué en traitement curatif sur des juvéniles (alevins et truitelles de poids inférieur à 5 grammes) à raison de 0,5 à 1 mg/L pendant 20 à 40 minutes, tous les 2 à 3 jours jusqu'à disparition des lésions externes.

Malgré les préconisations d'utilisation du vert malachite de la DGAI limitant son application aux œufs embryonnés et aux alevins de moins de 5 grammes, cette substance est aussi parfois appliquée en traitement curatif<sup>3, 4</sup> :

- sur les poissons reproducteurs affaiblis après la saison de ponte qui présentent alors des lésions importantes dues aux mycoses. La dose utilisée est de 2 à 3 mg/L tous les deux jours ;
- sur les truitelles atteintes d'hépatonéphrite parasitaire (Proliferative Kidney Disease) due à une myxosporidie, à raison d'un bain par semaine de mai à juillet.

Le vert malachite est parfois associé au formol afin de lutter contre les parasitoses externes. Pour ce faire, une solution de 5 g de vert malachite par litre de formol à 30 % est préparée. Cette solution est utilisée à la dose de 100 ml/m<sup>3</sup> pendant la même durée.

## 2 MECANISMES D'ACTION DU VERT MALACHITE

Le vert malachite est cytotoxique envers les bactéries et les cellules de mammifères. Il exerce son action "thérapeutique" en perturbant l'activité des enzymes de la chaîne respiratoire ; c'est un découplant des phosphorylations oxydatives mitochondriales et il inhibe l'activité des glutathion-S-transférases. On observe une destruction rapide des mitochondries, due à une déplétion énergétique.

## 3 DONNEES TOXICOLOGIQUES

### 3.1 Pharmacocinétique et toxicologie du vert malachite chez le poisson

#### **Résorption, distribution, métabolisme et élimination**

Le vert malachite est rapidement résorbé par les voies branchiale et cutanée. Cette résorption est d'autant plus rapide que le pH et la température de l'eau sont plus élevés. Puis le vert malachite gagne la circulation sanguine et est distribué dans les divers tissus et organes. Dans les cellules, il est rapidement métabolisé, notamment au niveau hépatique. Ses métabolites, dont le principal est le vert leucomalachite, sont distribués dans la graisse, les muscles, le rein et le foie où ils sont stockés. Si l'élimination du vert malachite de l'organisme est rapide, celle du vert leucomalachite est lente, particulièrement dans la graisse. L'élimination du vert malachite et du vert leucomalachite est d'autant plus rapide que la température de l'eau est plus élevée.

<sup>3</sup> Ces usages pourraient expliquer le nombre de résultats positifs (présence de résidus de vert malachite et de vert leucomalachite chez des poissons adultes) observés dans le cadre des plans de contrôle (voir chapitre 5).

<sup>4</sup> Le vert de malachite en thérapeutique piscicole. J.P. Gérard. Bulletin Français de Pisciculture. 1981. Note technique et traitement en pisciculture n° 04 bis.

Les études pharmacocinétiques du vert malachite chez les poissons indiquent clairement la persistance potentielle de résidus de vert malachite et de vert leucomalachite dans le muscle et la peau du poisson.

#### **Toxicité aiguë**

Le vert malachite présente une toxicité aiguë importante, se manifestant notamment par une perte progressive de l'équilibre. En effet, les concentrations létales 50 (CL<sub>50</sub>)<sup>5</sup> déterminées chez différentes espèces de poissons (juvéniles et alevins de truites, carpes ou tilapia) sont fréquemment proches des doses thérapeutiques.

#### **Toxicité chronique**

Selon les durées et les fréquences de traitement et selon les concentrations de vert malachite appliquées, on observe chez les différentes espèces de poisson des modifications hématologiques et biochimiques, le plus souvent transitoires.

Des effets plus sévères peuvent être observés comme des lésions hépatiques et branchiales constatées chez des truites arc-en-ciel exposées à 1,6 mg/L de vert malachite pendant 40 minutes tous les 7 jours pendant 7 semaines. Des lésions branchiales, intestinales, rénales, de la glande pituitaire et des gonades peuvent également être observées chez des juvéniles, selon les espèces, à des doses proches des doses thérapeutiques.

#### **Pouvoir mutagène**

Un test du micronucleus sur érythrocytes a été réalisé sur des carpes exposées au vert malachite (0,5 mg/L, bain d'une durée de six jours)<sup>6</sup>. Les résultats obtenus permettent de conclure à l'absence d'activité mutagène du vert malachite sur le génome de la carpe après une exposition de six jours.

#### **Pouvoir tératogène**

Une étude de tératogénicité<sup>7</sup>, réalisée en exposant des œufs de truite arc-en-ciel à des bains de vert malachite (1,3 ou 5 mg/L, une heure par jour pendant 30 jours ou une heure toutes les semaines pendant cinq semaines), met en évidence une augmentation de la fréquence d'anomalies du développement 3 semaines après l'éclosion. L'ensemble des résultats de cette étude permet de conclure à un pouvoir tératogène potentiel du vert malachite chez la truite arc-en-ciel.

#### **Pouvoir cancérogène**

Une étude de cancérogénicité<sup>8</sup> a été réalisée en exposant des truites arc-en-ciel à des bains de vert malachite (0, 0,3 ou 2 mg/L, une heure deux fois par semaine pendant 52 semaines). Les résultats obtenus permettent de conclure à l'absence d'activité

<sup>5</sup> Concentration du produit dans l'eau qui provoque 50 % de mortalité pour des temps d'exposition de 24, 48, 72 ou 96 heures.

<sup>6</sup> Svobodova Z., Groch L., Flajshans M., Vykusova B. and Machova J. The effect of long term therapeutic bath of malachite green on common carp. *Acta Vet. Brno*, 1997, 66 : 111-117.

<sup>7</sup> Meyer F.P. and Jorgensen T.A. Teratological and other effects of malachite green on development of rainbow and rabbits. *Transactions of American Fisheries Society*. 1983, 112 : 818-824.

<sup>8</sup> Kobayashi and coll. Etude non publiée.

cancérogène du vert malachite chez la truite arc-en-ciel dans les conditions de l'expérimentation.

### 3.2 Pharmacocinétique et toxicologie du vert malachite chez les mammifères

#### **Absorption, distribution, métabolisme et élimination**

Il n'existe pas de données sur l'absorption, la distribution et l'élimination du vert malachite et du vert leucomalachite chez les animaux de laboratoire. Concernant la métabolisation de ces deux substances, les travaux de Culp *et al.*<sup>9</sup>, montrent que, chez les rongeurs, le vert malachite est réduit au niveau hépatique en vert leucomalachite et que ces deux substances sont déméthylées par des déméthylases cytochrome P450 dépendantes ou par la peroxydase thyroïdienne en amines primaires et secondaires principalement. Ces métabolites pourraient être ensuite oxydés en métabolites susceptibles de réagir avec l'ADN. Il est à noter que le vert leucomalachite peut être ré-oxydé chez le rat en vert malachite que l'on retrouve dans le foie en quantité faible mais mesurable.

#### **Toxicité aiguë**

La toxicité aiguë du vert malachite par voie orale a été déterminée chez le rat (DL<sub>50</sub> : 275 (223 - 241) mg/kg p.c.). Les symptômes observés sont notamment une diminution de l'activité motrice, des diarrhées et une piloérection. On n'observe pas de différence de sensibilité liée au sexe. D'autres études, réalisées avec d'autres espèces et dans des conditions expérimentales différentes, fournissent des évaluations de la toxicité aiguë plus ou moins forte, du même ordre de grandeur que pour le rat.

Il n'y a pas de données expérimentales sur la toxicité aiguë par voie orale du vert leucomalachite. Une seule étude montre que des rats peuvent tolérer une dose de vert leucomalachite 10 fois plus forte que la dose létale de vert malachite par voie intraveineuse.

Il convient de noter que le vert malachite présente un pouvoir très irritant pour l'œil (évaluation du pouvoir irritant chez le lapin) et semble également toxique par inhalation (étude de la toxicité aiguë par voie respiratoire). Ce point est à prendre en considération lors de la manipulation de ce produit par les utilisateurs.

#### **Toxicité sub-aiguë**

Les seules études de toxicité sub-aiguë sont des essais par administrations répétées sur une durée de 28 jours chez le rat et la souris.

Les organes cibles sont le foie, la thyroïde et la vessie. Le vert leucomalachite serait plus toxique que le vert malachite<sup>10</sup>. Il semble que les effets les plus nets soient observés en particulier sur la thyroïde (effet sur les hormones et sur l'apoptose des cellules épithéliales

<sup>9</sup> Culp S.J, Blankenship L.R., Kusewitt D.F., Doerge D.R., Mulligan L.T. and Beland F.A. Toxicity and metabolism of malachite green and leucomalachite green during short-term feeding to Fisher 344 rats and B6C3F1 mice. *Chem. Biol. Interactions*, **122**, 153-170 (1999).

<sup>10</sup> Culp S.J, Blankenship L.R., Kusewitt D.F., Doerge D.R., Mulligan L.T. and Beland F.A. Toxicity and metabolism of malachite green and leucomalachite green during short-term feeding to Fisher 344 rats and B6C3F1 mice. *Chem. Biol. Interactions*, **122**, 153-170 (1999).

dans ce tissu). Une administration chronique de ces produits pourrait conduire à une stimulation de la thyroïde et des tumeurs de la glande comme cela a été déjà décrit pour le violet de gentiane (qui a une structure chimique identique). De même, les effets sur la vessie pourraient conduire à une hyperplasie de l'épithélium de cet organe.

La présence d'un adduit à l'ADN dans le foie, mis en évidence par post marquage, permet d'envisager une liaison directe des 2 composés ou de leurs métabolites (amines primaires et secondaires et métabolites N-oxydés) à l'ADN et un potentiel génotoxique pour le vert malachite et son dérivé réduit.

La dose sans effet (DSE) pour le vert malachite déterminée à partir de l'étude de toxicité de 28 jours par voie orale chez le rat est de 8 mg/kg p.c./j. Par contre, la DSE pour le vert leucomalachite n'a pas pu être déterminée à partir de l'étude de toxicité sur 28 jours par voie orale chez le rat (la première dose testée induisant un effet étant de 23 mg/kg p.c./j, on peut considérer que la DSE est inférieure à cette valeur).

#### **Pouvoir mutagène**

Le pouvoir mutagène du vert malachite et du vert leucomalachite a été évalué au travers d'un ensemble de tests de mutagenèse *in vitro* et *in vivo* (test de Ames, test du micronucleus sur moelle osseuse de souris, test d'aberrations chromosomiques, spot test sur souris, test des comètes).

Sur la base des résultats obtenus, le vert malachite paraît pouvoir être considéré comme non génotoxique *in vivo* et *in vitro*. Il convient de noter cependant que, compte tenu de la cytotoxicité du vert malachite qui nécessite de réaliser les essais avec de faibles doses, il est possible que le pouvoir génotoxique ne puisse pas s'exprimer dans les conditions des tests réalisés *in vitro*.

Cependant, la présence d'adduits à l'ADN dans le foie de rats au cours des études de toxicité sub-aiguë, les dommages à l'ADN observés dans le test des comètes en présence d'activation métabolique, la forte cytotoxicité, le caractère électrophile du produit et sa capacité de liaison à l'ADN doivent cependant être pris en compte dans l'interprétation des tests de cancérogenèse et dans l'analyse du risque.

Le vert leucomalachite est moins cytotoxique que la molécule parent pour les bactéries et les cellules de mammifères. Il n'est pas mutagène et n'induit pas de dommages à l'ADN dans le test des comètes. La génotoxicité du vert leucomalachite n'a pas été testée *in vivo*.

#### **Effets à long terme et cancérogenèse**

Aucune étude de cancérogenèse chez le rat (2 ans) ou la souris (18 mois) avec le vert malachite n'est disponible<sup>11</sup>.

Dans une étude d'initiation-promotion tumorale chez le rat<sup>12</sup>, le vert malachite administré par voie orale (eau de boisson) pendant 2,5 mois augmente l'incidence des lésions pré-

<sup>11</sup> Aux Etats-Unis, le National Toxicological Programme (financé par la US-FDA) a entrepris des études de cancérogenèse chez le rat et la souris dont les résultats sont attendus pour l'année prochaine.

<sup>12</sup> Fernandes C., Lalitha V.S. and Rao K.V.K. Enhancing effect of malachite green on the development of hepatic pre-neoplastic lesions induced by N-nitrosodiethylamine in rats. *Carcinogenesis* 12(5), 839-845 (1991).

néoplasiques induites dans le foie par la diéthylnitrosamine. La dose sans effet promoteur du vert malachite n'a pas pu être déterminée. Elle est inférieure à environ 1,5 mg/kg p.c./jour (25 mg/L dans l'eau de boisson). Cet effet promoteur du vert malachite a été confirmé par une étude<sup>13</sup> réalisée selon le même protocole mais dans laquelle ce produit était administré pendant 7 mois.

Sur la base de ces résultats, le vert malachite pourrait donc être considéré comme un promoteur de tumeurs.

Les effets à long terme et les effets cancérogènes du vert leucomalachite ne sont pas connus. On pourrait, pour cette substance, anticiper des effets à long terme sur la thyroïde (hyperplasie et tumeurs) par deux mécanismes possibles (i) une stimulation hormonale consécutive à une diminution de la thyroxine (T4) plasmatique ou (ii) un effet génotoxique direct sur la glande après métabolisation par la peroxydase thyroïdienne<sup>14</sup> en dérivés électrophiles et réaction avec l'ADN.

#### **Effets tératogènes**

Les effets du vert malachite sur la reproduction des mammifères ont été mis en évidence dans une étude sur des lapines traitées par gavage du 8<sup>ème</sup> au 18<sup>ème</sup> jour de la gestation avec de l'oxalate de vert malachite aux doses de 0, 5, 10 et 20 mg/kg p.c./j. Les résultats de cette étude montrent que le vert malachite présente un pouvoir fœtotoxique et tératogène chez la lapine. L'absence de relation dose/effet et la part possible de la toxicité maternelle dans l'apparition de certaines anomalies (retard d'ossification en particulier) n'ont cependant pas été prises en compte ni discutées. La DSE sur la reproduction est inférieure à 5 mg/kg p.c./j.

### **3.3 Conclusions sur la toxicité du vert malachite et du vert leucomalachite**

Les connaissances scientifiques relatives à la toxicité du vert malachite et du vert leucomalachite chez les animaux de laboratoire et chez l'homme comme chez le poisson sont très partielles.

#### **Chez les poissons**

La toxicité aiguë et chronique du vert malachite est élevée, les doses toxiques étant parfois proches des doses thérapeutiques. En outre, le vert malachite serait tératogène chez le poisson.

#### **Chez les animaux de laboratoire et chez l'homme**

De par sa structure chimique et les résultats de quelques études, le vert malachite pourrait être considéré comme un promoteur de tumeur.

L'absence de potentialité génotoxique du vert malachite n'est cependant pas complètement prouvée. Seules des études à long terme chez le rat et la souris devraient permettre

<sup>13</sup> K.V. Rao and C.L. Fernandes, Progressive effects of malachite green at varying concentration on the development of N-nitrosodiethylamine induced hepatic preneoplastic lesions in rats. *Tumori*, 82(3), 280-286 (1996).

<sup>14</sup> Doerge D.R., Chang H.C., Divi R.L. and Churchwell M.I. Mechanism for inhibition of thyroid peroxidase by leucomalachite green. *Chem. Res. Toxicol.* 11(9), 1098-1104 (1998).

d'évaluer convenablement le risque cancérigène du vert malachite et du vert leucomalachite, son dérivé réduit.

Le vert malachite est embryotoxique et induit des malformations des viscères et du squelette chez le lapin. En l'absence d'une relation dose/effet, les malformations observées peuvent être cependant la conséquence d'une toxicité maternelle suite au traitement.

Enfin, en raison de sa toxicité par inhalation et de son pouvoir irritant, le vert malachite présente un danger pour l'utilisateur dans les piscicultures.

#### **4 RESIDUS DE VERT MALACHITE ET DE VERT LEUCOMALACHITE DANS LES ŒUFS ET LA CHAIR DES POISSONS**

##### ***Résidus dans les œufs et les alevins***

Lorsque des œufs de saumon sont exposés au vert malachite (1 mg/L, bains d'un jour tous les trois jours pendant 24 jours) puis lorsque les alevins nés de ces œufs sont exposés au vert malachite (1 mg/L, bain d'un jour le sixième jour après l'éclosion), des résidus de vert malachite et de vert leucomalachite sont détectés dans les œufs et dans les alevins après l'éclosion des œufs (0,05 µg/g le 34<sup>ème</sup> jour après l'éclosion).

Lorsque des saumons reproducteurs sont exposés au vert malachite (1 mg/L, bains d'une heure par jour pendant 10 à 47 jours), des résidus de vert malachite et de vert leucomalachite sont détectés dans les œufs après la ponte (0,1 à 4,2 µg/g) et dans les alevins après l'éclosion des œufs (0,1 à 3,2 µg/g).

##### ***Résidus dans la chair de poissons adultes***

Lorsque des saumons ou des truites adultes sont exposés, de façon unique ou répétée, à des bains de vert malachite, des résidus de vert malachite et de vert leucomalachite sont détectés dans les muscles. Selon les auteurs, les concentrations musculaires de vert malachite et de vert leucomalachite deviennent inférieures à 10 µg/kg, soit 12 mois après le dernier bain à la température de 12 à 14 °C, soit 38 jours après le dernier bain à la température de 16 °C. Ces divergences peuvent en partie s'expliquer par des différences de conditions expérimentales et de méthodologie analytique.

##### ***Temps d'attente avant consommation***

Du fait de la présence détectable de résidus de vert malachite et surtout de vert leucomalachite durant de longues périodes après traitement et de la dépendance de la pharmacocinétique du vert malachite à la température, certains pays ont pris des mesures pour limiter la présence de ces résidus dans la chair des poissons au moment de leur commercialisation en établissant un délai d'attente calculé en degré-jour.

Dans la pratique, afin d'éviter la présence de résidus dans la chair des poissons commercialisés, la plupart des pays utilisateurs ont réduit l'utilisation prophylactique du vert malachite vis-à-vis des infections fongiques au traitement des œufs embryonnés et des alevins de moins de 5 grammes.

##### ***Résultats des plans de contrôle***

Dans le cadre de la directive 96/23/CE relative aux mesures de contrôle à mettre en œuvre à l'égard de certaines substances et de leurs résidus dans les animaux vivants et leurs produits, les autorités françaises recherchent depuis 1995 la présence de résidus de vert



malachite et de vert leucomalachite dans les poissons d'élevage (salmonidés), les poissons d'étang et les poissons marins. Les résultats des échantillons analysés en France depuis 1995 présentant des résidus de vert malachite/leucomalachite à des teneurs supérieures à 10 µg/kg dans la chair des poissons de pisciculture sont les suivants :

	1995-1996	1998	1999	2000	2001
Nombre d'échantillons analysés	147	376	332	352	313
% de résultats positifs (> 10 µg/kg)	28,6	10,1	13	15,9	5,8

*Limite de détection : 1 µg/kg*

Bien que le nombre d'échantillons analysés dans d'autres Etats-membres soit beaucoup plus faible qu'en France (de l'ordre de 5 à 20 fois moins), des résultats positifs ont également été observés.

## 5 METHODES ANALYTIQUES DE DOSAGE DU VERT MALACHITE ET DE SES DERIVES

De nombreuses méthodes ont été décrites pour doser le vert malachite et le vert leucomalachite dans le muscle de poisson. Les méthodes de dosage incluent le vert leucomalachite. D'autres métabolites ont été mis en évidence dans le muscle de plusieurs espèces de poisson : produits de déméthylation du vert leucomalachite et du vert malachite issus en grande partie d'une dégradation enzymatique de ces molécules. Ces produits de déméthylation représentent environ 10 % de la concentration totale en vert malachite et de ses dérivés. Ils ne sont pas pris en compte, pour le moment, dans les analyses de routine.

La méthode de dosage pratiquée en France<sup>15</sup> utilise la chromatographie liquide haute performance (CLHP) couplée à une détection photométrique dans le visible. Elle met en œuvre une étape d'oxydation du vert leucomalachite en vert malachite avant la phase séparative. Il s'agit donc d'une estimation des deux molécules, vert malachite et vert leucomalachite.

La limite de détection de la méthode (1 µg/kg) permet une détection des résidus de vert malachite et de vert leucomalachite à des concentrations bien inférieures au seuil de positivité appliqué en France (10 µg/kg).

## 6 EFFETS SUR L'ENVIRONNEMENT<sup>16</sup>

Aucune information publiée n'est disponible sur le devenir du vert malachite dans l'environnement, ni sur les effets possibles sur la faune et la flore non cibles.

<sup>15</sup> Méthode diffusée dans les laboratoires de contrôle par la note de service DGAI n° 8138 du 1<sup>er</sup> juillet 1996.

<sup>16</sup> Gouranchat C.G. Le vert malachite en aquaculture (état actuel des connaissances et perspectives). Etude bibliographique. *Thèse pour le diplôme d'état de Docteur Vétérinaire*, 30 octobre 2000.

La toxicité aiguë du vert malachite a cependant été étudiée par des essais de laboratoire sur des organismes aquatiques n'étant pas la cible du produit. Les valeurs de CL<sub>50</sub> 96 heures obtenues sur ces organismes montrent une très grande disparité de potentiel toxique, comprises entre 0,068 mg/L et 122 mg/L.

Les quelques études qui ont été réalisées sur la persistance du vert malachite dans l'environnement sont contradictoires. En l'absence de données relatives à sa biodégradation et à son devenir dans l'environnement, et étant donné les conditions d'utilisation non contrôlées et la difficulté de traiter les eaux après baignade des organismes, notamment lorsque le vert malachite est utilisé pour traiter des poissons juvéniles ou adultes, il est difficile de se prononcer sur les conséquences de son utilisation sur l'environnement.

## 7 EVALUATION DES RISQUES POUR LE CONSOMMATEUR

Dans l'état actuel des connaissances, en se fondant sur l'étude d'initiation-promotion tumorale hépatique réalisée chez le rat dans laquelle un effet promoteur du vert malachite a été mis en évidence à la dose de 1,5 mg/kg p.c./jour et en appliquant un facteur de sécurité de 10 000 (données expérimentales insuffisantes), il est possible de calculer une Dose Journalière Admissible (DJA) provisoire de 0,15 µg/kg p.c./j, soit, pour une personne de 60 kg, 9 µg/personne/jour.

Dans un scénario d'exposition maximaliste, l'ingestion de 300 grammes<sup>17</sup> par jour de poisson d'aquaculture ou d'étang au seuil de positivité de 10 µg/kg exposerait l'individu à une quantité de vert malachite et de vert leucomalachite de 3 µg/personne/jour, soit 33 % de la DJA provisoire estimée.

## 8 PRODUITS DE SUBSTITUTION

Etant donné le profil toxicologique du vert malachite, son remplacement en élevage suscite le plus grand intérêt dans de nombreux pays<sup>18</sup>. Un certain nombre de produits de substitution, présentant une efficacité similaire sans ses inconvénients toxiques, a été recherché<sup>19</sup>.

Parmi les "candidats" potentiels pour le traitement des infections fongiques et/ou bactériennes, deux produits paraissent plus particulièrement intéressants à étudier :

<sup>17</sup> Ration alimentaire utilisée par le Comité du Codex Alimentarius et par l'Union européenne pour fixer les LMR de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments.

Selon les données de l'enquête de consommation alimentaire INCA 1999, en France, la consommation moyenne de poisson toutes espèces confondues est de 29,54 g pour les adultes et de 20,32 g pour les enfants ; la consommation des plus forts consommateurs (97,5<sup>ème</sup> percentile) est de 108,57 g pour les adultes et de 71,43 g pour les enfants.

<sup>18</sup> Bulletin de l'European Association of Fish Pathologist (EAFP), 2002, 22(2) pages 152 à 157.

<sup>19</sup> Gouranchat C.G. Le vert malachite en aquaculture (état actuel des connaissances et perspectives). Etude bibliographique. *Thèse pour le diplôme d'état de Docteur Vétérinaire*, 30 octobre 2000.

- l'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) qui présente l'intérêt de ne pas générer de résidus et de posséder une activité antifongique démontrée expérimentalement. Certains éleveurs l'utiliseraient déjà de façon régulière avec succès en France mais la posologie et la fréquence d'utilisation n'ont pas fait l'objet d'une publication ;
- le bronopol. Ce principe actif est inscrit à l'Annexe II du règlement (CE) N° 2377/90 pour son utilisation sur les œufs embryonnés de salmonidés en pisciculture. Il est efficace contre les champignons et les bactéries. Il ne nécessite pas de définition de limite maximale de résidus (LMR). En 2001, une demande d'extension a été faite pour tous les stades de développement des poissons pour le traitement prophylactique des infections fongiques et bactériennes. Pour l'instant, aucune préparation commerciale ne semble avoir été soumise avec cette indication en vue d'obtenir une autorisation de mise sur le marché (AMM), sauf au Royaume-Uni où une préparation aurait reçu une autorisation provisoire pour le traitement des œufs.

Concernant le traitement de l'hépatonéphrite parasitaire, la fumagilline, antibiotique commercialisé pour le traitement des amibiases humaines, a été démontrée efficace contre le parasite de cette infection des truites mais également contre d'autres parasites des poissons. Elle ne figure cependant dans aucune des annexes du règlement (CE) N° 2377/90.

## CONCLUSION

### ***Du point de vue toxicologique***

Considérant que les connaissances toxicologiques et pharmacocinétiques chez le poisson et chez les mammifères présentent des lacunes, en particulier concernant :

- son rôle (ou celui de ses métabolites) dans la cancérogenèse (initiateur/promoteur)<sup>20</sup> ;
- la présence d'adduits à l'ADN dans le foie et dans la thyroïde (qui mériterait d'être approfondie)<sup>21</sup> ;
- les dommages potentiels à l'ADN induits par le vert malachite dans le test des comètes *in vivo* sur les organes du rat (qui restent à vérifier)<sup>16</sup> ;
- l'absence de données sur les effets clastogènes *in vitro* et *in vivo* du vert leucomalachite ;
- le nombre insuffisant de données sur les effets potentiels du vert malachite sur la reproduction, hormis des études fragmentaires chez la lapine et le poisson ;
- le nombre insuffisant de données sur l'impact du traitement des œufs embryonnés sur les poissons à l'âge adulte et leur descendance ;

Considérant que le composé principal retrouvé dans le muscle de poisson est le vert leucomalachite et que ce dérivé serait moins toxique que le vert malachite ;

<sup>20</sup> Un projet de recherche est par ailleurs envisagé par l'Afssa en vue de mieux cerner le mécanisme d'action du vert malachite et de ses métabolites en tant qu'initiateur ou promoteur de cancérogenèse. L'étude de cancérogenèse en cours conduite par la FDA aux Etats-Unis dans le cadre du "National Toxicology Programme" devrait d'apporter des éléments indispensables en complément de l'étude prévue par l'Afssa.

<sup>21</sup> Le projet de recherche envisagé par l'Afssa prévoit également d'apporter des éléments scientifiques complémentaires sur ce point.

Considérant toutefois qu'en l'état actuel des connaissances :

- en se fondant sur une étude d'initiation-promotion tumorale hépatique réalisée chez le rat, il est possible de calculer une dose journalière admissible (DJA) provisoire de 0,15 µg/kg p.c./j, soit, pour une personne de 60 kg, 9 µg/personne/jour,
- dans un scénario d'exposition maximaliste, l'ingestion de 300 grammes<sup>22</sup> par jour de poisson d'aquaculture ou d'étang au seuil de positivité de 10 µg/kg exposerait l'individu à une quantité de vert malachite et de vert leucomalachite de 3 µg/personne/jour, soit 33 % de la DJA provisoire estimée ;

Considérant par ailleurs qu'en raison de sa toxicité par inhalation et de son pouvoir irritant, le vert malachite présente un danger pour l'utilisateur dans les piscicultures ;

***Du point de vue de son utilisation***

Considérant qu'étant donné l'efficacité du vert malachite, une utilisation raisonnée de cette substance était tolérée en France jusqu'à ce jour, la limitant aux œufs embryonnés et aux alevins de moins de 5 grammes en précisant que les bains ayant servi au traitement ne devaient pas entrer en contact avec les poissons d'un stade de développement supérieur ;

Considérant qu'en dépit des limitations préconisées, le nombre d'échantillons de poissons adultes contrôlés au-dessus du seuil de positivité de 10 µg/kg de résidus de vert malachite et de vert leucomalachite est élevé, traduisant une utilisation non maîtrisée du vert malachite en pisciculture ;

Considérant que la présence de résidus de vert malachite et surtout de vert leucomalachite peut être détectée durant de longues périodes après traitement ;

Considérant qu'en l'absence de données relatives à sa biodégradation et à son devenir dans l'environnement, il est difficile de se prononcer sur les conséquences de l'utilisation du vert malachite sur l'environnement ;

***Du point de vue de son statut en tant que médicament vétérinaire***

Considérant que le vert malachite, utilisé pour le traitement de maladies fongiques et parasitaires, rentre dans la définition du médicament vétérinaire selon l'article R.5111-1 du code de la santé publique : "*On entend par médicament vétérinaire toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ...*"

Considérant que le vert malachite ne figure sur aucune des annexes I, II et III du règlement (CE) n° 2377/90 et qu'il n'entre actuellement dans la composition d'aucun médicament vétérinaire bénéficiant d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) ;

<sup>22</sup> Ration alimentaire utilisée par le Comité du Codex Alimentarius et par l'Union européenne pour fixer les LMR de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments.  
Les données de consommation de l'enquête INCA 1999 indique que l'ensemble de la population française adulte consomme en moyenne 29,5 g/pers/j de poisson et que les forts consommateurs (97,5<sup>ème</sup> percentile) consomment 108,6 g/pers/j de poisson.

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments estime que les conditions actuelles d'utilisation du vert malachite ne peuvent être considérées comme satisfaisantes au plan de la sécurité sanitaire au regard des considérations suivantes :

1. Compte tenu de ses propriétés et de son utilisation dans le traitement des maladies fongiques et parasitaires, le vert malachite est un médicament vétérinaire et devrait être utilisé dans le cadre de la législation relative au médicament vétérinaire ; c'est pourquoi, ne disposant ni d'une limite maximale de résidu (LMR), ni d'une autorisation de mise sur le marché, ni d'une autorisation temporaire d'utilisation, ses conditions actuelles d'utilisation ne sont pas conformes à la réglementation ; le fait que le produit utilisé soit directement la matière première ne dispense pas de la réalisation des études d'efficacité et d'innocuité prévues par la législation ;
2. L'assimilation du vert malachite à un colorant a servi de base à la mise en place d'un encadrement de son utilisation ; or, malgré les prescriptions limitant l'utilisation à certains stades de la production, il apparaît que les conditions réelles d'utilisation ne sont pas conformes aux conditions posées par cet encadrement, puisque bien que le traitement ne soit autorisé que pour les oeufs embryonnés et les jeunes alevins, des résidus sont régulièrement trouvés dans des poissons au stade de la commercialisation, comme en attestent les résultats des plans de contrôle ;
3. Pour estimer le risque pour le consommateur, il n'existe que des informations fragmentaires, les données toxicologiques étant insuffisantes ; toutefois, il ne ressort pas des résultats des plans de surveillance que les quantités résiduelles constatées conduisent à un dépassement de la dose journalière admissible (DJA) provisoire telle qu'elle a pu être déterminée par le Comité d'experts spécialisé ;
4. Dans ce contexte, une restriction effective de l'utilisation du vert malachite au seul traitement des œufs embryonnés, accompagnée de toutes dispositions pour éviter la contamination des poissons à un stade de développement ultérieur par un traitement efficace des effluents issus des bains de traitement des œufs avant rejet dans l'environnement, permettrait de tendre vers l'absence de résidus dans les chairs des poissons issus de ces œufs et donc de restreindre l'exposition des consommateurs à ce produit ou à ses métabolites ;
5. Si le recours au vert malachite est considéré comme indispensable au traitement de nombreuses pathologies des poissons d'élevage, il convient d'envisager aux plans national et communautaire une régularisation de la situation conforme aux exigences de la législation sur le médicament vétérinaire, qui se fonde sur des principes de santé publique ; des recommandations seront formulées dans un délai de deux mois, au vu des données supplémentaires qui auront pu être transmises à l'agence sur les conditions et délais dans lesquels une LMR pourrait être fixée au niveau européen, les perspectives concernant la recherche de produits de substitution et les précisions sur les pratiques en aquaculture.

**Martin HIRSCH**