



Maisons-Alfort, le 22 Août 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'*Ostréopsis ovata*

LA DIRECTRICE GÉNÉRALE

#### 1. RAPPEL DE LA SAISINE

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie 27/7/2007 d'une demande d'appui scientifique et technique et d'avis relatif à la consommation de produits de la mer en présence d'*Ostréopsis ovata*.

#### 2. QUESTIONS POSEES

Il est demandé à l'Agence d'examiner les questions suivantes :

**Question I :** dans un premier temps, établir un état de l'art des méthodes disponibles en France de détection dans les produits de la mer des toxines produites par *Ostréopsis ovata*, en particulier la palytoxine, et indiquer les seuils en toxines à prendre en compte dans les produits de la pêche au delà desquels les produits sont susceptibles d'être dangereux pour la santé.

**Question II :** dans un deuxième temps,

1. établir un état de l'art des méthodes disponibles de détection dans les produits de la mer des toxines produites par les autres espèces toxinogènes du genre *Ostréopsis*
2. proposer des recommandations d'évolution du dispositif général de surveillance du milieu marin et des aliments mis sur le marché (en particulier la pertinence d'inclusion de la surveillance *Ostréopsis ovata*)
3. préciser la nature des études complémentaires nécessaire pour mieux caractériser ce risque

Le présent document est relatif à la question I.

#### 3. TOXINES PRODUITES PAR *Ostréopsis ovata* EN PARTICULIER LA PALYTOXINE

##### S'agissant des toxines produites par le genre *Ostréopsis*

La palytoxine et ses analogues font partie des phycotoxines émergentes dans les eaux tempérées du monde.

La palytoxine tient sa dénomination du fait qu'elle a été isolée et purifiée pour la première fois à partir d'un corail mou du genre *Palythoa* (Moore and Scheuer 1971) et sa structure a été élucidée une dizaine d'années plus tard (Moore and Bartolini 1981; Uemura, Hirata et al. 1985).

Depuis, des dinoflagellés benthiques appartenant au genre *Ostreopsis* ont été identifiés comme producteurs de toxines analogues à la palytoxine, appelées génériquement sous le terme de « palytoxine-like » et dans certains cas dénommées de manière spécifique.

Le tableau suivant dresse la liste des espèces du genre *Ostreopsis* et leurs toxines associées (d'après Katikou, 2007) :

| Espèce productrice      | Toxine   | Considérée analogue de la palytoxine ? | Références bibliographiques   |
|-------------------------|--|--|---|
| <i>O. siamensis</i>     | Non nommée<br>Ostréocine-D                           | Non connu 1981<br>Oui                  | (Nakajima, Oshima et al. 1981)<br>(Usami, Satatake M. et al. 1995)<br>(Ukena, Satake et al. 2001;<br>Ukena, Satake M et al. 2002) |
| <i>O. mascarenensis</i> | Non nommée<br>Mascarenotoxine-A<br>Mascarenotoxine-B | Non connu 1994<br>Oui<br>Oui           | (Quod 1994)<br>(Turquet et al. 2002)<br>(Lenoir, Ten-Hage et al. 2004;<br>Lenoir 2004)  |
| <b><i>O.ovata</i></b>   | <b>Non nommée</b>                                    | <b>Oui</b>                             | (Nakajima, Oshima et al. 1981)<br>(Penna, Vila et al. 2005)   |
| <i>O. lenticularis</i>  | Ostreotoxine<br>Ostreotoxine 1<br>Ostreotoxine 3     | Non connu<br>Non connu<br>Non connu    | (Tindall, Dickey et al. 1984)<br>(Mercado, Viera et al. 1994)<br>(Meunier, Mercado et al. 1997)                                   |
| <i>O. heptagona</i>     | Non nommée   | Non connu                              | (Norris, Bomber et al. 1985)  |

#### S'agissant d'*Ostreopsis ovata*

Sa présence a été rapportée dans plusieurs parties du monde, dans l'océan pacifique (Fukuyo 1981; Yasumoto, Naoko et al. 1987), la mer des caraïbes (Tindall, Miller et al. 1990), les côtes atlantiques brésiliennes (Granéli, Ferreira et al. 2002) et enfin dans la mer méditerranée en Italie et en Espagne (Tognetto, Bellato et al. 1995; Sansoni, Borghini et al. 2003; Penna, Vila et al. 2005) (Aligizaki and Nikolaidis 2006). *O. ovata* est la plus petite des espèces (40-60 µm). Il est probable que la morphogénétique montre qu'il existe d'autres espèces proches (Penna, Vila et al. 2005). La structure de la toxine (ou des toxines) d'*O.ovata* n'a pas été élucidée jusqu'à présent. Son caractère « palytoxine-like » a été établi à partir d'études de ses caractéristiques physico-chimiques en prenant pour référence la palytoxine. De plus, les souches d'*O.ovata* testées en provenance du Brésil, d'Italie et d'Espagne ont montré une forte activité hémolytique retardée, inhibée en présence de ouabaïne, ainsi qu'une toxicité chez la souris avec des symptômes typiques de la palytoxine (Granéli, Ferreira et al. 2002) (Penna, Vila et al. 2005; Riobó, Paz et al. 2006).

#### 4. TRANSFERT DANS LES PRODUITS DE LA MER

La possibilité de transfert des palytoxines-like dans la chaîne alimentaire aquatique a été démontrée à la suite de plusieurs cas d'intoxications alimentaires survenues jusqu'à présent uniquement dans les zones tropicales et sub-tropicales. Le syndrome d'intoxication par les palytoxine-like est généralement appelé palytoxicose, avec des déclinaisons en fonction de l'organisme marin vecteur à l'homme, clupéotoxisme par les poissons clupéidés (harengs, sardines, anchois) et xanthitoxisme par certaines espèces de crabes ou autres poissons. Dans ces zones coralliennes, la voie de transfert majeure dans ces organismes est la prédation de *Palythoa* comme montré par l'étude dans les Caraïbes par Mebs (1998) où un phénomène de bio-amplification est montré chez les organismes vivant dans le même habitat (échinodermes, annélides, crabes, anémones, poissons herbivores, poissons carnivores) (Mebs 1998). Il ne faut cependant pas exclure la possibilité d'une voie par absorption directe d'*Ostreopsis*. En effet, lors d'une intoxication à Madagascar par des sardines contaminées, des cellules d'*O.siamensis* ont été retrouvées dans le tractus intestinal du poisson (Onuma, Satake et al. 1999).

Dans nos zones tempérées, où *Ostreopsis* n'est apparu que depuis ces dernières années, peu de données sont actuellement disponibles sur le transfert dans la chaîne alimentaires marine. En Espagne, Riobó (comm. personnelle) signale la présence de palytoxine-like et d'acide okadaïque (une toxine lipophile diarrhéique) dans des clams produits dans la région d'Almeria suite à l'efflorescence d'*Ostreopsis* de 2003.

Afin de pouvoir compléter ces données, il s'avère nécessaire de poursuivre la mise au point de méthodes et leur validation pour la détection et/ou la quantification des composés palytoxine-like. Compte tenu du transfert possible sur plusieurs niveaux trophiques, il est nécessaire que ces méthodes s'appliquent aux échinodermes, coquillages, poissons, et crustacés.

## 5. METHODES D'ANALYSE

Plusieurs méthodes, biologiques et physico-chimiques, ont été mises au point pour détecter la présence de composés du type palytoxine-like. Dans cette partie ne seront mentionnées que les méthodes pouvant être utilisées à des fins de surveillance, en dépistage ou en confirmation avec des commentaires quant à leur caractère d'adaptabilité à la problématique d'analyse de produits marins. Les méthodes utilisées à des fins de recherche seront brièvement citées. En fin de cette partie, les possibilités et capacités actuelles en France d'analyse de produits marins pour la détection de telles toxines sont indiquées .

### Méthodes biologiques

- Dès le début des épisodes toxiques dus aux palytoxines-like, les scientifiques ont développé **un bioessai sur souris** pour détecter la présence et quantifier ces toxines dans un extrait (Teh and Gardiner 1974). Il s'agit d'un test intégratif qui a l'avantage de prendre en compte tous les analogues de toxines potentiellement présents et une droite de régression permet de relier le temps de mort de la souris à une quantité de toxines. La nature des symptômes observés chez la souris permet de les relier aux palytoxines-like (vacillements, pertes d'équilibre, paralysie progressive, ataxie, perte d'activité locomotrice, difficultés respiratoires et mort par arrêt respiratoire). *En matière d'adaptabilité, ce bioessai sur souris a été appliqué à des échantillons toxiques de crabes (Penna, Vila et al. 2005). Pour ce type d'essai, une extraction classique a été menée sans poser de problèmes majeurs d'interférences dans le test. Ce bioessai requiert 2 à 3 jours pour sa mise en oeuvre, compte tenu qu'il nécessite une observation des souris sur 24h et une logistique pour l'approvisionnement en souris.*
- La palytoxine présente un fort potentiel hémolytique. De ce fait, **un test hémolytique** a été développé en utilisant des érythrocytes de souris (Habermann, Ahnert-Hilger et al. 1981). Il permet d'analyser sur des hématies de souris la libération de l'hémoglobine dans le milieu au contact de la toxine. Cette hémolyse est détectable par spectrophotométrie à 450 nm. Il s'agit là encore d'un test basé sur la détection de tous les analogues ayant cette même action biologique. Il peut être quantitatif par comparaison à une droite de calibration à partir de palytoxine. *En matière d'adaptabilité, ce test hémolytique est réalisé sur des microplaques de 96 puits, ce qui permet de ne pas consommer trop d'extrait et de tester plusieurs échantillons en même temps. Ce test peut permettre de détecter des niveaux bas de toxines mais uniquement sur des extraits de microalgues. La mise au point de techniques d'extraction et de purification est nécessaire pour rendre applicable ce test à des matrices plus complexes telles que coquillages, poissons, crustacés et oursins.*
- Dans le cadre des développements récents pour le dépistage des biotoxines, les **tests sur lignées cellulaires** sont basés sur le mode d'action spécifiques d'une famille de toxines. Sur cette base, un test de dépistage des palytoxines-like sur des cellules de neuroblastomes de souris (Neuro-2A) est en cours de mise au point (Ledreux, comm pers.). Ce test permettrait de discriminer les palytoxines-like des autres biotoxines marines neurologiques (saxitoxines, brevétoxines) qui sont réalisés en microplaques.

*En matière d'adaptabilité, comme pour le test hémolytique, ce **test cellulaire (Neuro-2A)** devant se réaliser sur des microplaques de 96 puits, permettrait de ne pas consommer trop d'extrait et de tester plusieurs échantillons en même temps. La mise au point de techniques d'extraction et de purification est nécessaire pour rendre applicable ce test aux produits de la mer.*

### Méthodes physicochimiques

La palytoxine possède 2 groupements fonctionnels absorbant dans les ultra-violet à 2 longueurs d'onde spécifiques (UV). Cette propriété physico-chimique a été à la base du développement de méthodes analytiques par **chromatographie liquide à haute performance couplée à une détection UV (CLHP/UV)**. C'est l'équipe de Yasumoto qui, en 1998, a développé une méthode permettant de mettre en évidence la présence de palytoxine dans des extraits de poissons. *Pour répondre à la problématique, la palytoxine étant le seul étalon des palytoxines-like disponible commercialement, cette méthode **CLHP/UV** ne permet pas de confirmer la présence d'autres analogues dans un extrait. De plus cette méthode n'est pas très sensible en raison de la faiblesse d'absorption de chromophores de la palytoxine. Néanmoins, c'est une méthode qui peut être facilement mise en œuvre dans un laboratoire de surveillance mais dont les étapes d'extraction et de purification à partir des divers produits de la mer doivent être optimisées pour améliorer la sensibilité.*

Dans le but d'améliorer la sensibilité, Riobó et al., 2006 ont développé une méthode de séparation par CLHP en couplant une détection fluorimétrique (**CLHP/F**), après « dérivatisation pré-colonne » (Riobó, Paz et al. 2006). Après extraction, il s'agit de « transformer » les palytoxines-like de manière à les rendre fluorescentes. Ainsi, après séparation par CLHP, elle peuvent être détectées par une mesure fluorimétrique, plus sensible que la mesure d'absorption UV. *Pour répondre à la problématique cette méthode **CLHP/F** même si elle améliore la limite de détection se heurte à la seule disponibilité de la palytoxine comme analyte de référence et a été appliquée uniquement pour des extraits d'algues et non pour des matrices plus complexes.*

Plusieurs méthodes par **chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse simple (CL/SM) ou en tandem (CL/SM-SM)** sont en cours de mise au point. Le principe de la séparation est du même ordre que celui présenté précédemment, tandis que la détection est basée sur le rapport masse/charge des molécules d'intérêt. Ce type de méthodes présente de nombreux avantages car il permet de rechercher non seulement la palytoxine pour laquelle un étalon commercial est disponible mais également les autres analogues (comme le cas d'*O. ovata*) pour lesquels les masses moléculaires respectives sont maintenant connues. De plus, grâce au profil de fragmentation, spécifique d'une famille, il permet de confirmer la présence des toxines. Par référence à une calibration par la palytoxine, il permet également de quantifier les teneurs en toxines dans un échantillon et de disposer d'un profil toxinique de l'échantillon. *Pour répondre à la problématique, ces méthodes basées sur la **spectrométrie de masse** représentent le meilleur potentiel mais jusqu'à présent, elles ont essentiellement été réalisées sur des extraits de microalgues productrices de palytoxines et analogues et nécessiteraient aussi d'être optimisées au niveau des étapes d'extraction et de purification pour permettre l'analyse des matrices complexes que sont les produits de la mer. Il serait judicieux que ces méthodes puissent être améliorées par l'addition d'étapes de pré-concentration sur cartouche en ligne et de séparation sur microcolonnes, comme réalisé par Lenoir et Hennion sur des échantillons d'*Ostreopsis mascarenensis* (en cours). Il est à préciser que ces méthodes nécessitent une haute technicité et du matériel coûteux.*

### Méthodes utilisées en recherche

D'autres méthodes sont développées pour la recherche de la présence de palytoxine-like. Cependant, compte tenu de la technicité nécessaire pour les mettre en œuvre, ces tests constituent des outils restreints à une utilisation dans un cadre de recherche. Il s'agit par exemple, d'un test basé sur la mesure des ions potassium libérés par l'action de la palytoxine (Lau, Ng et al. 1996) et

d'un test immuno-radioactif utilisant de l'iode radioactif lié à des anti-corps anti-palytoxine (Levine, Fierro et al. 1981).

#### S'agissant des possibilités actuelles en France de détection des toxines d'*O.ovata*

- Méthodes de dépistage

Le LNR (Afssa/Lerqap/TOP), en étroite collaboration avec le Muséum National d'Histoire Naturelle (thèse de A. Ledreux financée par l'AFSSA), travaille actuellement sur le développement de 2 méthodes de dépistage, **le test hémolytique et le test Neuro-2A**. Les travaux sur les étalons de palytoxine ont été réalisés et ont permis d'optimiser les paramètres optimaux des méthodes. Les premiers essais réalisés à partir de matrices complexes, en particulier les moules, ont mis en évidence la nécessité d'améliorer la préparation des échantillons (extraction, purification). Il sera encore nécessaire de tester les principales autres espèces de coquillages (huîtres, palourdes, pectinidés) ainsi que des poissons. Le travail est donc amorcé, présente des potentialités et nécessite encore plusieurs mois avant de pouvoir conclure sur la nécessité de valider ces méthodes comme outils de dépistage. Un délai supplémentaire est à prévoir pour une adaptabilité large à tous les produits de la mer concernés (tels que coquillages, poissons, crustacés et oursins). Leur utilisation n'est pas encore envisageable en cas d'épisode toxique pour une prise de décision.

Le **bioessai sur souris** n'a pas été testé par le LNR mais il semble que la méthode, telle que décrite dans la littérature puisse être appliquée sans difficulté majeure. Il faut toutefois préciser que l'utilisation de bioessais sur animaux est, depuis ces dernières années, soumise à de nombreuses contestations d'un point de vue éthique et que le choix d'outil doit s'orienter vers des tests alternatifs. Au niveau technique, les résultats positifs devront quoi qu'il en soit être soumis à une analyse de confirmation par CL/SM.

- Méthodes analytiques physico-chimiques

Par ailleurs, au cours du printemps 2007, le LNR a procédé à la mise en œuvre de la méthode par **CLHP/F** (fluorimétrique) publiée par Riobó et al. (2006) et développée sur les microalgues (Riobó, Paz et al. 2006). Après adaptation de l'extraction à des extraits de coquillages supplémentés, cette méthode s'est avérée inapplicable pour des matrices complexes : lors de la dérivation des extraits, de nombreux composés co-extraits réagissent également et rendent la mesure non interprétable. Il a alors été décidé de ne pas poursuivre les travaux avec cette méthode dont les résultats ont été jugés non satisfaisants.

Le LNR et le Laboratoire Phycotoxines de l'Ifremer Nantes sont conjointement en cours de développement d'une méthode par **LC/SM-SM**. Ces méthodes sont développées à partir de la palytoxine étalon et par supplémentation sur des matrices. Dans le cadre du développement, les 2 équipes disposent également d'extraits de **la microalgue *O. ovata*** prélevée et transmise par le laboratoire d'Ifremer Toulon. En cas d'épisode toxique sur les côtes méditerranéennes françaises, les méthodes existantes dans ces 2 laboratoires ont la potentialité d'être utilisées pour faire des investigations sur des échantillons de microalgues (Ifremer Nantes) et de produits de la mer (LNR et Ifremer Nantes) et d'estimer les teneurs en toxines présentes. Il faut toutefois noter que les méthodes nécessitent encore des optimisations, aussi bien de l'extraction que de la détection, et une validation sur les différents types de matrices avant de permettre une **quantification avec des performances connues**.

*Pour répondre à la problématique*, il est prématuré de préconiser « **la** méthode la mieux adaptée » car ce choix est à conditionner au type de dispositif à adopter en regard de l'évaluation du risque d'exposition associé aux proliférations de ces espèces de micro algues.

Enfin, si des étalons commerciaux de palytoxine sont disponibles, il faut préciser qu'aucun d'entre eux n'est certifié et qu'il n'existe pas de matériau de référence certifié, ce qui est un frein à une validation telle que strictement définie dans les normes actuelles.



## 6. SEUILS DE TOXINES A PRENDRE EN COMPTE

La toxicité de la palytoxine et de ses analogues dépend non seulement de la nature de la toxine mais également de l'espèce contaminée et de la voie d'administration de la toxine. Elle apparaît comme étant le composé marin le plus toxique connu à l'heure actuelle avec une DL50 de seulement 33 ng/ kg déterminée par voie intraveineuse chez le chien. Rhodes et al. (2003) ont déterminé la DL50 de la palytoxine pure chez la souris par voie IP : 0,75 µg/kg. Une dose de 1,5 µg/kg est létale chez cet animal qui meurt en 3 à 5h de suffocation.

Aucune évaluation de risques n'a été menée jusqu'à présent pour la palytoxine et les palytoxines-like. Il faut préciser que cette famille fait partie du programme de travail qui sera traité à l'EFSA à travers son Groupe de Travail (dont le responsable du LNR Français est membre) actuellement chargé de la ré-évaluation des seuils des toxines réglementées et de l'évaluation de toxines émergentes. Il ne devrait pas y avoir de seuil fixé avant fin 2008.

Dans ce Groupe de Travail sera revue l'estimation du seuil de salubrité qui avait été établie par un Groupe de Travail initié par le LCR en octobre 2005 à 250 µg palytoxine / kg poisson (Working Group on Toxicology, Oct 2005) (Portion de 250 g pour un individu de 60 kg).

## 7. CONCLUSIONS

En conclusion, des méthodes de dépistage comme de confirmation sont également développées dans plusieurs pays européens et le LCR a initié un GT, dont le LNR français fait partie, pour la problématique scientifique et analytique spécifique du risque alimentaire lié aux palytoxines-like dans les produits de la mer. La 1<sup>ère</sup> réunion est prévue en octobre 2007.

## Références

- Aligizaki, K. and G. Nikolaidis (2006). "The presence of the potentially toxic genera *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) in the North Aegean Sea, Greece." T. Harmful Algae **5**: 717-730.
- Fukuyo, Y. (1981). "Taxonomical study on benthic dinoflagellates collected in coral reefs." Bull. Jap. Soc. Sci. Fish **47**: 967-978.
- Granéli, E., C. E. L. Ferreira, et al. (2002). Book of abstracts Xth International Conference on Harmful algae (Florida).
- Habermann, E., G. Ahnert-Hilger, et al. (1981). "Delayed haemolytic action of palytoxin general characteristics." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **649**(2): 481-486.
- Katikou, K. (2007). "Chemistry of palytoxins and ostreocins." *In* : Phycotoxins : Chemistry and biochemistry." Luis Botana editor. Blackwell publishing. pp 75-93.
- Lau, C., F. Ng, et al. (1996). "Inhibition of sodium-dependent uptake processes in purified rat brain synaptosomes by *Lophozozymus pictor* toxin and palytoxin." Neurochem Int. **28**(4): 385-90.
- Lenoir, S., L. Ten-Hage, et al. (2004). "First evidence of palytoxin analogues from an *Ostreopsis mascarenensis* (Dinophyceae) benthic bloom in Southwestern Indian Ocean." J. Phycol. **40**: 1042-1051.
- Lenoir, T.-H., Turquet, Quod, Bernard, Hennion (2004). "First evidence of palytoxin analogues from an *Ostreopsis Mascarenensis* (dinophyceae) benthic bloom in southwestern Indian Ocean." J. Phycol. **40**: 1042-1051.
- Levine, B., M. F. Fierro, et al. (1981). "A tetrachloroethylene fatality." J. Forensic. Sci **26**: 206-209.

- Mebs, D. (1998). "Occurrence and sequestration of toxins in food chains." Toxicon **36**(11): 1519-22. to food poisoning.
- Mercado, J. A., M. Viera, et al. (1994). "An extraction procedure modification changes the toxicity, chromatographic profile and pharmacological action of *Ostreopsis lenticularis* extracts." Toxicon **32**: 256.
- Meunier, F. A., J. A. Mercado, et al. (1997). "Selective depolarization of the muscle membrane in frog nerve-muscle preparations by a chromatographically purified extract of the dinoflagellate *Ostreopsis lenticularis*." Brit. J. Pharmacol **121**: 1224-1230.
- Moore, R. E. and G. Bartolini (1981). "Structure of palytoxin." Journal of the American Chemical Society **103**( 9): 2491-4.
- Moore, R. E. and P. J. Scheuer (1971). "Palytoxin: a new marine toxin from a coelenterate." Science **172**: 495-498.
- Nakajima, I., T. Oshima, et al. (1981). "Toxicity of benthic dinoflagellates in Okinawa." Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish **47**: 1029-1033.
- Norris, D. R., J. W. Bomber, et al. (1985). Benthic dinoflagellates associated with ciguatera from Florida Keys. I. *Ostreopsis heptagona* sp. nov. Toxic dinoflagellates. D. M. Anderson, A. W. White and D. G. Baden, Elsevier, New York: 39-44.
- Onuma, Y., M. Satake, et al. (1999). "Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism." Toxicon **37**(1): 55-65.
- Penna, Vila, et al. (2005). "Characterization of *ostreopsis* and *coolia* (dinophyceae) isolates in the western mediterranean sea based on morphology, toxicity and internal transcribed spacer 5.8S rDNA sequences." j.phycol. **41**: 212-225.
- Quod, J. P. (1994). "*Ostreopsis mascarenensis* sp. nov. (Dinophyceae), a new toxic Dinoflagellate from coral reefs in the South West Indian Ocean." CRYPTOGAMIE ALGOLOGIE **15**(4): 243-251.
- Riobó, Paz, et al. (2006). "Analysis of palytoxin-like in *Ostreopsis* cultures by liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorescence detection." Analytica Chimica Acta.
- Sansoni, G., B. Borghini, et al. (2003). "Fioriture algali di *Ostreopsis ovata* (Gonyaulacales. Dinophyceae) : un problema emergente." Biologia Ambientale **17**(1): 17-23.
- Teh, Y. F. and J. E. Gardiner (1974). "Partial purification of *Lophozozymus pictor* toxin." Toxicon **12**(6): 603-604.
- Tindall, D. R., R. W. Dickey, et al. (1984). Ciguatoxic dinoflagellates from the Caribbean sea. Seafood toxins. E. P. Ragelis. Washington, D.C., American Chemical Society: 225-240.
- Tindall, D. R., D. M. Miller, et al. (1990). Toxicity of *Ostreopsis lenticularis* from the British and United States Virgin Islands. Toxic Marine Phytoplankton. E. Granéli, B. Sundström, L. Edler and D. M. Anderson: 424-429.
- Tognetto, L., S. Bellato, et al. (1995). "Occurrence of *Ostreopsis ovata* (Dinophyceae) in the Tyrrhenian Sea during summer 1994." Bot. Mar **38**: 291-295.
- Turquet, J., Lenoir, S., Quod, J.P., Ten-Hage, L., and Hennion, M.C., 2002. Toxicity and toxin profiles of a bloom of *Ostreopsis mascarenensis*, Dinophyceae, from SW Indian Ocean. Book of Abstracts, 10<sup>th</sup> International Conference on Harmful Algae, Florida, USA, 286.
- Uemura, D., Y. Hirata, et al. (1985). "Studies on palytoxin." Tetrahedron **41**: 1007-1017.

Ukena, T., Satake M, et al. (2002). "Structural confirmation of ostreocin-D by application of negative-ion fast-atom bombardment collision-induced dissociation tandem mass spectrometric methods." Rapid Commun Mass Spectrom. 2002; **16**(24 .): 2387-93.

Ukena, T., M. Satake, et al. (2001). "Structure elucidation of ostreocin D, a palytoxin analog isolated from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*." Biosci Biotechnol Biochem **65**(11): 2585-8.

Usami, N., Satatake M., et al. (1995). "Palytoxin analogs from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*." J. Am. Chem. Soc. **117**: 5389-5390.

Yasumoto, Naoko, et al. (1987). "Marine Toxins Produced by Marine Dinoflagellates." Biol Bull **172**: 128-131.

**La Directrice Générale  
Pascale BRIAND**