



TABLE RONDE CIGUATERA

Mercredi 28 août 1991, NOUMEA

Rapporteurs : D. LAURENT et P. AMADE

Cette table ronde a été organisée à l'initiative de l'ORSTOM de Nouméa, grâce au concours financier de la CORDET, de la Direction Générale et du département Santé de l'ORSTOM.

Cette table ronde était présidée par Raymond BAGNIS, Chargé de mission pour la Recherche et la Technologie auprès du Haut Commissaire de la Polynésie Française

Etaient présents :

- Philippe AMADE, ORSTOM de Nouméa, Nlle-Calédonie
- Gilbert BALAVOINE, CNRS, France
- Georges DIOGENE, INSERM, France
- Michel GAUTHIER, IFREMER de Nouméa, Nlle-Calédonie
- Jean-Pierre GIRARD, Université de Nice, France
- Jean-Marc GROGNET, CEA, France
- Michèle GUYOT, MNHN, France
- Pascale JOANNOT, Aquarium de Nouméa, Nlle-Calédonie
- Dominique LAURENT, ORSTOM de Nouméa, Nlle-Calédonie
- Anne-Marie LEGRAND, Institut Malardé, Polynésie Française
- Marc LITAUDON, Université de Christchurch, Nlle Zélande
- Serge MAESTRINI, CNRS, France
- André MENEZ, CEA, France
- Serge PAUILLAC, Institut Pasteur, France
- Danielle PESANDO, INSERM, France
- Bernard PHILIPPON, ORSTOM, France
- Catherine RAUSCH, IFREMER, France
- Kathia INTRANOVA, Secrétaire du Symposium

Un premier tour de table s'est déroulé dans le but de mettre en évidence :

- l'identité des participants et leur implication dans les études sur la ciguatera,
- les collaborations avec les autres organismes,
- les financements des programmes,
- les projets de contribution aux divers programmes.

EQUIPES OU ORGANISMES FRANÇAIS DÉJÀ IMPLIQUÉES DANS LA RECHERCHE SUR LA CIGUATÉRA

1) Institut Territorial de Recherches Médicales Louis Malardé de Papeete (Polynésie Française)

représenté par le Dr Anne Marie Legrand. L'équipe est formée de deux chercheurs, trois techniciens supérieurs et d'un VAT.

Collaborations :

- Equipe du Dr Yasumoto (Tohoku University, Sendai, Japon).
- Equipe du Pr Avrameas (Institut Pasteur de Paris, France).
- Dr J. Molgo, neurobiologiste (CNRS de Gif sur Yvette, France).
- Dr E. Benoit et Pr E. Coraboeuf (Université Paris XI, Orsay, France).



Financements :

- Subvention du territoire de Polynésie Française.
- Crédits de recherche du :
 - . MRT via IP : pour deux ans pour des études immunochimiques.
 - . CORDET : pour deux ans sur les cultures de *Gambierdiscus toxicus*.
 - . Institut Pasteur.
- Recettes des analyses médicales effectuées par l'Institut.

2) INSERM, unité 303 de Villefranche sur Mer :

représenté par Mme Danielle Pesando et Georges Diogène, étudiant en thèse de 3ème cycle sous la responsabilité de Mme Clément-Durand.

Une équipe de l'unité travaille sur la maïtotoxine

- production de *Gambierdiscus toxicus* (culture),
- extraction de la toxine,
- étude de son mécanisme d'action et plus précisément de son action au niveau des canaux calciques sur cellules animales (fibroblastes) et sur oeufs d'oursins,
- modèles cellulaires pour la détection et la quantification des toxines.

Collaborations :

- Dr J. PH. Breittmeyer (Unité INSERM 343, Nice).
- Université de Nice.
- Pr. Bruslé (Université de Perpignan).
- Ecole vétérinaire de Nantes (étude des dinoflagellés à St Barthélémy).

Financements :

- CORDET (ciguatera à St Barthélémy).
- Contrat DRET (étude de la maïtotoxine).
- Nouveau financement MRT en toxicologie pour travailler sur :
 - * la perméabilité calcique sur spermatozoïdes d'oursins,
 - * la toxicité des poissons - présence d'enzymes de biotransformation (cytochrome P450 par exemple), mise en évidence et dosage.

Projet :

- Possibilité de collaboration avec J. P. Quod (La Réunion) sur la présence de *Gambierdiscus* à Mayotte.

3) ORSTOM :

représenté par Bernard Phillipon, Directeur du Département Santé (Paris), Dominique Laurent, chargé de recherche (Nouméa) et Philippe Amade, chargé de recherche INSERM sur poste d'accueil au centre ORSTOM de Nouméa.

L'ORSTOM s'intéresse aux plantes médicinales utilisées dans les remèdes traditionnels dans le Pacifique Sud, en étudiant leurs effets sur des souris intoxiquées par de la ciguatoxine et pratique aussi les cultures algales de *Gambierdiscus toxicus*.

Collaborations :

- Institut Malardé.
- Dr R. Lewis (Queensland Dept. of Primary Industries de Brisbane, Australie).
- Pr Bruslé (Université de Perpignan).

Financements :

- Fonds propres ORSTOM.
- INSERM sur deux ans.
- CORDET sur deux ans.

**4) Institut Pasteur :**

représenté par Serge Pauillac (Institut Pasteur Outre-Mer) actuellement au laboratoire d'immunocytochimie de l'IP de Paris. Etude des problèmes de détection des toxines dans le poisson.

Collaborations :

- l'Institut Malardé, où S. Pauillac devrait être affecté l'année prochaine.

Financements :

Contrat MRT pour 2 ans (1989- 1990), dont bénéficie pro parte l'Institut Malardé.

5) Université de Nice :

représentée par le professeur Jean Pierre Girard du laboratoire "Etude physiologique cellulaire et comparée" de l'Unité CNRS 651. Etude de la toxicité des toxines sur le modèle des oeufs d'oursins.

Collaborations :

- INSERM, Villefranche sur Mer.

Financements :

- Ancien fonds MRT (embryotoxicité)
- financement partiel MRT (toxicologie)

6) IFREMER :

représenté par Catherine RAUSCH qui prépare une thèse au centre IFREMER de Nantes sous la direction de P. Lassus. Son travail n'est pas spécifique de la ciguatera mais son option de relation entre dinoflagellés et bactéries pour la production de toxine est une des voies de recherche possibles.

Financements :

Pas de financement spécifique ; profite des financements du programme national "Efflorescences algales marines".

ORGANISMES, ÉQUIPES OU PARTICULIERS INTÉRESSÉS PAR DES RECHERCHES SUR LA CIGUATÉRA**1) CEA :**

représenté par André Menez, responsable du secteur Ingénierie des protéines au CEN de Saclay et Jean-Marc Grognet du service de Pharmacologie et d'Immunologie du CEN de Saclay.

André Menez s'intéresse surtout aux protéines toxiques, mais est très intéressé par les problèmes de la ciguatera ; intérêt qu'il avait déjà manifesté, il y a quelques années, auprès de Raymond Bagnis alors en quête d'informations et de collaborations auprès des laboratoires français.

Le CEA est toujours prêt à s'impliquer dans cette recherche en apportant son expérience dans les molécules radiomarquées au C14 ou au Tritium et dans les techniques de dosages radio-immunologiques et enzymologiques associées à des unités de production d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux.

2) CNRS :

représenté par Gilbert Balavoine, Directeur adjoint du Département Chimie du CNRS. Il est présent à cette réunion pour manifester l'intérêt de cet organisme pour un programme national sur la ciguatera.

3) IFREMER :

représenté par Serge Maestrini, Directeur de recherche au centre CNRS - IFREMER du CREMA-L'Houmeau et responsable du programme national "Efflorescences algales marines",



et par Michel Gauthier, responsable de l'antenne IFREMER de Nouméa. Ils participent tous deux à cette réunion en observateurs pour le compte de la direction générale de l'IFREMER qui voudrait s'impliquer dans cette recherche sur un créneau non occupé.

4) MRT :

représenté par Raymond Bagnis, délégué régional du MRT pour la Polynésie Française. Il n'est plus directement concerné par la recherche mais est toujours intéressé par ce grave problème et prêt à mettre son expérience à la disposition des chercheurs actifs.

5) Museum National d'Histoire Naturelle :

représenté par Mme Michèle Guyot, Directeur de recherches au CNRS et responsable du laboratoire de chimie URA 401 du MNHN. Spécialiste des produits d'origine marine, Mme Guyot est chargée de mission au CNRS pour mettre sur pied un programme ciguatera. Elle travaille actuellement sur l'acide okadaïque.

6) Divers

Marc Litaudon : actuellement en Post Doc à l'Université de Christchurch. A travaillé à l'Institut Louis Malardé de Papeete durant son temps de Volontaire à l'Aide Technique. Il désire continuer des recherches sur la chimie des toxines ou sur leur biogénèse.

Pascale Joannot, Directrice de l'Aquarium de Nouméa. Elle vient de soutenir sa thèse sur les coraux de Nouvelle-Calédonie et s'intéresse à la ciguatera. Elle peut apporter un soutien logistique.

DEBAT

A la suite de ce tour de table, la discussion s'est engagée sur les problèmes majeurs que les chercheurs ont rencontré dans la recherche sur la ciguatera. Tous s'accordent à dire que le facteur limitant est le manque de toxines disponibles.

1) Problème crucial : production de la toxine :

- Pêche :

Il est rappelé qu'il a fallu pêcher en Polynésie 5 tonnes de murène, extraire 150 kg de foies et viscères, pour isoler 1/3 de mg de ciguatoxine et qu'il est arrivé que 2 tonnes de ce poisson récolté dans un atoll n'aient rien apporté.

Deux autres possibilités de production de toxine sont envisageable : par la culture cellulaire de *Gambierdiscus toxicus* (GT) ou bien par biosynthèse, éventuellement par synthèse totale.

- Cultures cellulaires de GT :

Plusieurs équipes cherchent à obtenir les toxines ciguatériques par les cultures de *G. toxicus*. La production de maïtotoxine (MTX) ne pose pas de problème mais il est très difficile de produire de la ciguatoxine (CTX).

Les dernières études montrent qu'il existe des variations importantes dans la capacité des souches de GT à produire des toxines. Est-ce un problème génétique ou physiologique, ou encore un problème de flore associée ? Des études de toxicogénèse seraient nécessaires pour éclaircir ce point.

Les bactéries souvent associées aux GT pourraient être impliquées dans la toxicogénèse. En cas de réponse affirmative, la culture de ces bactéries pourrait être plus facile que celle des GT. Plusieurs équipes travaillent déjà dans ce sens, sans résultats semble-t-il, mais



des progrès sont attendus ; actuellement, une bonne souche de GT productrice donne 1 mg de CTX pure à partir de 4 à 5000 litres de culture. Yasumoto a obtenu 200 µg d'un analogue de la CTX avec 1000 litres de culture.

Néanmoins, cela ne semble pas évident puisqu'actuellement, nous ne dominons que des cultures en récipients de 10 ou 20 litres, avec agitation pendant 4 à 5 semaines.

Il est suggéré d'utiliser des billes de verre pour augmenter le volume.

Des variations de la source d'azote ou de phosphore peuvent peut-être améliorer le rendement comme cela est le cas pour d'autres algues toxiques, mais beaucoup d'essais ont déjà été effectués sans succès sur le milieu de cultures des GT.

D'autres laboratoires dont l'IFREMER étant spécialisés dans la culture de GT ou d'autres microalgues, la question est posée de savoir si un laboratoire serait intéressé par des essais de cultures en grande quantité d'une souche sélectionnée pour sa toxicité et sa richesse en CTX.

La MTX est plus facilement obtenue par cultures cellulaires : 2 ou 3 MTX ont déjà été isolées.

Est-il possible d'envisager que la ciguatoxine soit un produit de dégradation de la MTX ? Les derniers résultats d'analyse structurale ne sont pas en faveur de cette hypothèse. En effet comment expliquer qu'une molécule hydrosoluble très polaire comme la MTX donne par des hydroxylations la CTX qui est liposoluble ?

Néanmoins, pour infirmer ou confirmer cette hypothèse, une expérience relativement simple pourrait être réalisée; il s'agirait d'incorporer à des microsomes de foies de poisson (ou humains) de la maïtotoxine marquée, de voir son devenir et de rechercher de la ciguatoxine marquée, ou, plus simplement, de comparer les effets toxiques sur des souris

Biosynthèse

La voie biosynthétique de la CTX pourrait être assez simple et s'effectuer à partir de dérivés acéto-acétiques ou propioniques. Il faudrait les radiomarquer au C14 et les incorporer au milieu de cultures des GT.

Le CEA propose son infrastructure spécialisée dans les marqueurs radioactifs pour étudier ces problèmes de biosynthèse en collaboration avec une équipe habituée à pratiquer les cultures d'algues. Ces études pourraient permettre de définir les précurseurs de la CTX.

L'hypothèse de l'intervention d'enzymes branchants a aussi été avancée.

2) Analyse structurale

Ces précurseurs pourraient aussi être isolés à partir des cultures de cellules non marquées. Mais il n'y a pas d'analyse exhaustive des produits extraits des cultures, en particulier des molécules plus petites qui pourraient être des précurseurs ; il faudrait les étudier pour comprendre la biosynthèse et donc trouver des équipes compétentes pour faire des cultures importantes et d'autres intéressées par l'analyse des produits. Ces dernières équipes existent en France, ce sont des spécialistes de spectrographie de masse ou de RMN, il faut les motiver.

R. Bagnis rappelle les problèmes qu'il a rencontré il y a quelques années vers 1980 lorsqu'il cherchait des collaborateurs pour étudier la chimie de la CTX. A l'époque, le CEA avait proposé ses services mais le financement nécessaire n'a pas été obtenu. Plus tard, quand la CTX a été purifiée à Tahiti, il se trouve que le Pr Yasumoto s'est proposé pour faire des analyses structurales. C'était en 1988. Cette table ronde a justement pour but de limiter ce genre de collaboration évitable en orchestrant au niveau national les recherches sur la ciguatera.

D'autres études structurales seront nécessaires car une vingtaine de CTX ont déjà été isolées mais deux seulement ont été complètement caractérisées.



3) Détection

Le but est de trouver un test commercialisable, utilisable sur le terrain pour déceler un poisson potentiellement dangereux, sans éliminer les poissons sains.

Le problème est de trouver un test pour détecter d'infimes quantités. En effet, on recherche quelque chose qui existe en quantité infinitésimale dans le poisson et à des doses plus ou moins fortes. A une certaine dose, cela devient toxique. Laquelle ? Si l'on y ajoute le fait que la sensibilité humaine est très variable, le seuil acceptable de la toxine dans le poisson est extrêmement difficile à définir. Le problème économique n'est pas à négliger.

Là encore, un des facteurs limitants dans la mise au point du test est de ne disposer que de très faibles quantités de toxines. La quantité disponible n'a pas permis de réaliser toutes les expériences voulues et il a fallu travailler sur une molécule de remplacement, la brévétotoxine.

Dans le domaine de la détection, le CEA peut aussi apporter sa contribution avec son expérience dans les couplages d'une substance avec des protéines comme l'albumine qui seront porteuses d'une information immunogénique.

L'intérêt d'une fixation à la place d'un anticorps du récepteur ou d'un fragment du récepteur qui a une affinité de 10^{-12} M et qui a l'énorme avantage de disposer d'un site unique est aussi débattu (le récepteur jouant le rôle d'un piège à toxine).

4) Divers

D'autres questions ont été abordées comme :

- l'étude du mécanisme d'action
- la modification du comportement des poissons ciguatériques. Subissent-ils des dégénérescences hépatiques. Le laboratoire du professeur Bruslé de l'université de Perpignan travaille sur ce problème par comparaison de poissons toxiques et non toxiques récoltés en Polynésie Française et en Nouvelle-Calédonie ainsi que par étude du foie de poissons intoxiqués expérimentalement par des GT.
- la propagation naturelle des GT
- la niche écologique des GT
- les réactions d'oxydations par le cytochrome P450
- l'utilisation des dérivés fluorescents dans la détection et le risque de faux-positifs.
- les marquages radioactifs pour des études pharmacologiques pouvant s'effectuer au CEA. On peut imaginer l'utilisation du tritium vu la présence de doubles liaisons dans la CTX et à condition que ces doubles liaisons ne soient pas importantes pour l'interaction avec la cible du canal sodium puisqu'elles seraient réduites. Ces expériences ne nécessiteraient dans un premier temps que quelques μg de toxine et seraient très intéressantes pour étudier la spécificité de la ciguatoxine avec sa cible.
- le devenir de la MTX dans la chaîne alimentaire.
- l'étude épidémiologique qui est utile mais qui revêt un caractère variable dans le temps et dans l'espace ce qui rend impossible la réalisation de cartes des régions touchées par la ciguatera ; l'étude de cette variabilité pourrait d'ailleurs être une source d'informations.
- le mannitol qui permet une amélioration non seulement des formes cliniques sévères mais est aussi efficace sur les signes neurologiques et digestifs des formes ambulatoires.
- la recherche de possibilité de manger les poissons toxiques sans s'intoxiquer. Le calcium a été utilisé comme protecteur dans certaines îles. Une étude sur la souris avait effectivement montré un léger effet protecteur. L'idéal serait un antidote préventif, sans danger spontanément pour l'homme, capable de neutraliser les effets néfastes de la ciguatoxine notamment.



CONCLUSION

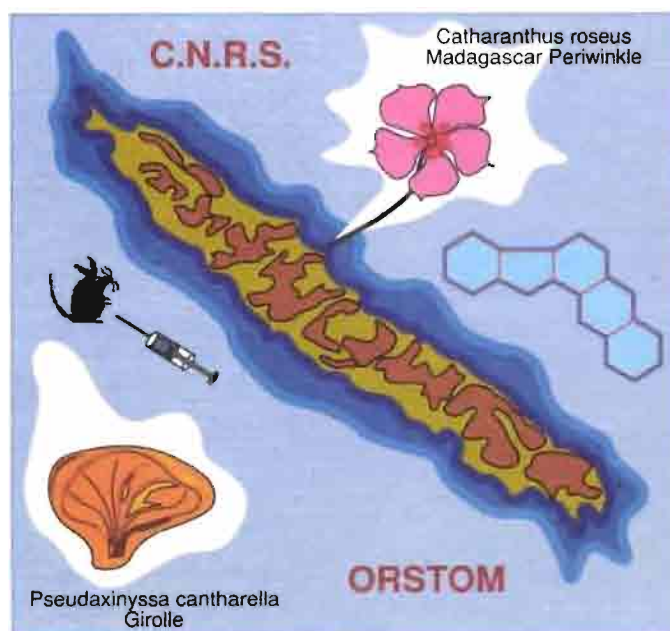
Cette table ronde a mis en évidence les points importants suivants sur lesquels il est nécessaire de progresser :

- la production de ciguatoxine, soit par cultures d'algues, soit par biosynthèse,
- l'étude de la toxicogénèse et le rôle des bactéries associées aux GT dans celle-ci,
- la relation maïtotoxine- ciguatoxine ; réactions d'oxydation par des microsomes ou du cytochrome isolé,
- le suivi épidémiologique et écologique.

Troisième Symposium sur les substances naturelles d'intérêt biologique de la région Pacifique-Asie

Nouméa, Nouvelle-Calédonie, 26-30 Août 1991

ACTES



Editeurs : Cécile DEBITUS, Philippe AMADE,
Dominique LAURENT, Jean-Pierre COSSON