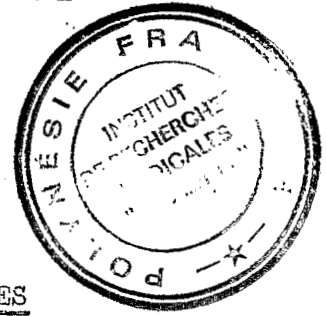


SPC/Medicinal Plants/W.P. 28
8 Novembre 1973

ORIGINAL : FRANCAIS



COMMISSION DU PACIFIQUE SUD

CONFERENCE TECHNIQUE REGIONALE DES PLANTES MEDICINALES

Papeete, Tahiti, 12 - 17 novembre 1973

RECHERCHES PRELIMINAIRES SUR L'EVENTUEL POUVOIR
INSECTICIDE D'EXTRAITS DE POISSONS CIGUATERIGENES

Par G. PICHON * et R. BAGNIS **

Avec la collaboration technique de

G. FEVAI (+), N. LEFEVRE et S. THEVENIN (++)

- Institut de Recherches Médicales Louis Malardé -
B.P. 30 - Papeete-Tahiti-Polynésie Française

1 - INTRODUCTION

L'observation du comportement des mouches vis à vis d'un poisson qui vient d'être ramené à terre, est utilisée par de nombreux Polynésiens comme moyen de détection de la ciguatera : ainsi un poisson sur lequel les mouches se posent mais ne restent pas est aussitôt rejeté à la mer.

A partir de cette donnée empirique, il paraissait intéressant de tester l'effet insecticide éventuel de certains extraits ciguateriques, d'autant que la néréistoxine extraite des vers annélides Nereis a été découverte au Japon à partir d'une constatation du même ordre (OKAICHI et HASHIMOTO, 1962).

./....

-
- * Entomologiste médical ORSTOM
 - ** Médecin de 1ère Classe du Service de Santé des Armées
 - (+) Pharmacienne
 - (++) Techniciennes de laboratoire

O.R.S.T.O.M. Fonds Documentaire

N° : 28972

Cpte : B

Déjà WORTON à Hawaii (1969, in litt.) avait fait agir des extraits de poissons vénéneux sur des moustiques adultes. Mais les premiers résultats positifs ne purent être reproduits par la suite.

Une première série d'expérimentations utilisant des mouches adultes appartenant aux espèces Musca domestica et Calliphora sp. fut mise en oeuvre à Tahiti. Elle ne fournit aucun résultat significatif (PICHON, BAGNIS, THEVENIN, 1972 - non publié).

C'est alors que fut envisagé l'emploi des larves d'Aedes aegypti. Ce choix se justifiait parfaitement car ce moustique est devenu un animal standard de laboratoire au même titre que la souris blanche ou la drosophile. Une importante monographie lui a été consacrée (CHRISTOPHERS, 1960).

Son élevage facile, son développement rapide (une douzaine de jours), sa fertilité et la longue survie de ses oeufs à sec (plusieurs mois) en font le prototype pour l'étude des moustiques en particulier, et des insectes en général (CRAIG, 1965). Ae. aegypti constitue un matériel de choix pour le "screening" de nouveaux insecticides. Il suffit d'ajouter le produit étudié à l'eau dans laquelle vivent les larves, et de compter les survivants après un temps donné.

Grâce à l'OMS (1960), cette méthode est fortement normalisée, et le fait que l'on puisse travailler sur de grands effectifs d'individus se trouvant dans des conditions physiologiques aussi analogues que possible la rend suffisamment précise.

2 - TECHNIQUES ET METHODES

2.1. Obtention des extraits

La technique d'extraction est celle de SCHEUER et coll. (1967). Nous avons utilisé quatre lots de poissons de lagon dont la toxicité avait été au préalable évaluée qualitativement sur le chat. Il s'agit de deux lots de poissons perroquets Scarops rubroviolaceus et de deux lots de poissons chirurgiens, Ctenochaetus striatus (tableau 1). Leurs muscles sont broyés, déshydratés, puis malaxés dans de l'acétone. L'extrait acétonique, filtré par gravité, est ensuite évaporé sous vide. Le résidu obtenu est mélangé à de l'éther, puis mis à décanter. Il y a formation de deux couches. La couche inférieure, aqueuse, est atoxique. On évapore la couche supérieure étherée, jusqu'à obtention d'un résidu sec, qui est pesé afin d'évaluer le rendement de l'extraction. Le témoin est un poisson pélagique (bonite) de l'espèce Katsuwonus pelamis, jamais ciguatérigène.

Pour effectuer le test, une partie des différents résidus obtenus est placée en solution dans de l'alcool absolu pur. Le pH de cette solution mère est sensiblement neutre. On prépare ensuite des solutions-filles par dilutions successives au demi dans l'alcool absolu. Deux heures environ avant le début du test, on ajoute 1 ml de ces solutions à 200 ml d'eau distillée. Pour le premier stade des calculs, à la plus forte concentration (obtenue par la solution mère) est affectée la valeur provisoire de 200 unités par litre, quelle que soit la quantité d'extrait effectivement présente. Les résultats sont ensuite ramenés au poids initial de chair de poisson, et exprimés en équivalents-grammes de muscle par litre (EGM/l). Après homogénéisation par agitation dans une bouteille de verre, le liquide est versé dans un bol en tôle émaillée. On procède pour les bols successifs par ordre de concentration croissante.

2.2. Tests sur les larves

=====

2.2.1. Technique O.M.S.

Nous avons appliqué la technique utilisée pour l'étude de la sensibilité aux insecticides, décrite par BROWN (1958) et BROWN et PAL (1971). Les larves utilisées dans chaque test avaient le même âge, à deux heures près.

Le troisième jour après l'éclosion, les larves sont groupées en lots de vingt individus dans des tubes borel contenant environ 5 cc d'eau. Le tout est versé dans les bols en tôle émaillée, dans lesquels se trouvent les différentes solutions hydroalcooliques à tester.

La durée du contact est de 24 heures. Après cette période, à l'aide d'une passoire à thé, on transfère les larves légèrement rincées au robinet dans de nouveaux bols contenant de l'eau distillée. On effectue le décompte définitif des larves survivantes après 24 heures d'observation.

Nous avons effectué deux épreuves pour chaque extrait toxique et trois épreuves pour le témoin bonite. Tous les tests ont été réalisés dans un laboratoire climatisé, dont la température oscille entre 24 et 26°C. Chaque épreuve comprenait également un bol témoin, contenant 200 cc d'eau distillée et 1 cc d'alcool absolu. Dans le cas où il survenait une certaine mortalité sur les lots témoins, nous avons corrigé la mortalité observée dans les bols à l'aide de la formule d'ABBOTT.

La principale difficulté provenait de la miscibilité médiocre des solutions alcooliques des cinq extraits toxiques dans l'eau distillée. Pour la solution de bonite aux fortes concentrations, en particulier, il y avait de nettes différences entre les

./....

trois épreuves, avec parfois formation d'une pellicule grasse à la surface. Il est certain que cet artefact risque de fausser les résultats, car les larves peuvent alors mourir par asphyxie.

Tous les tests ont été pratiqués en suivant une méthode aveugle : celui qui effectuait le décompte des survivants ignorait l'identité du poisson testé et la quantité d'extrait effectivement présente dans la solution mère.

Les mortalités correspondant aux différentes doses sont portées sur du papier " log-probit ". S'il y a normalité, la courbe représentative de la loi dose-mortalité peut être représentée par une droite, définie par deux paramètres :

- la dose létale 50 (DL 50), dose donnant 50 % de mortalité ;
- la pente (correspondant à l'inverse de l'écart-type).

La courbe théorique de chaque extrait a été déterminée par la méthode du maximum de vraisemblance (ou des probits de travail).

Tous les résultats statistiques sont exprimés au seuil de significativité 5 %.

3 - RESULTATS

3.1. Extraits

3.1.1. Extraits de poissons toxiques

L'examen des graphiques de mortalités (figure 1) indique que les extraits sont, par toxicité décroissante, dans l'ordre MT3, MT2, MT5 et MT1. Le système de quatre droites parallèles, ajusté " à vue " à ces graphiques a pour pente 2,1. On les nomme respectivement : III, II, V et I.

Le test de linéarité n'est pas significatif (Chi^2 observé : 1,56 ; Chi^2 théorique : 11,1). Notre hypothèse suivant laquelle les lois dose-mortalité des quatre extraits toxiques sont normales, se trouve donc justifiée, et il est possible de calculer pour chacun d'eux l'intervalle de confiance de sa DL 50 (tableau 2).

./.....

Les tests de parallélisme effectués pour chaque couple de droites, se révèlent non significatifs pour les couples I - II, II - V et I - V (χ^2 observés : I - II : 1,6 ; II - V : 0,3 ; I - V : 2,5 ; χ^2 théorique : 3,84). En revanche la pente théorique de l'extrait MT3 est significativement plus faible, ce qui indique une plus grande variance.

La figure 2 représente les droites correspondant aux quatre extraits. On peut mesurer les DL 50 des quatre extraits avec une précision variant de 4,2 à 9,6 % (tableau 2).

3.1.2. Extrait de bonite

La présence de cet extrait provoque une certaine mortalité. La formation d'une pellicule huileuse aux fortes concentrations est susceptible d'entraîner la mort des larves par asphyxie. Cet épiphénomène se traduit par une forte hétérogénéité des résultats, d'une épreuve à l'autre, pour une même dose théorique.

Il faut cependant remarquer, comparativement aux quatre extraits toxiques, que la mortalité n'est pas totale aux plus fortes concentrations employées (200 unités). Au cours d'essais préliminaires, quelques larves avaient même survécu à une dose cinq fois supérieure, bien que le milieu d'expérience présentât un aspect très trouble, et une consistance apparemment impropres à la survie d'Ae. aegypti.

3.2. Toxicité initiale des poissons

=====

Pour évaluer la toxicité initiale de la chair de poisson par unité de poids, il suffit de savoir à combien de grammes de l'extrait initial correspondent x unités provisoires, puis de multiplier ce nombre par l'inverse du rendement d'extraction. Les doses sont alors exprimées en équivalents-grammes de muscle par litre (E.G.M/l).

Les résultats définitifs sont illustrés par la figure 3.

Les DL 50 de chaque poisson, qui définissent sa toxicité, sont rangés dans l'ordre : MT3, MT2, MT5 et MT1. Mais seule la DL 50 de MT1 diffère de façon significative des trois autres.

./.....

Pour une même quantité de chair, on constate qu'à 100 % de mortalité chez le poisson le moins toxique, correspond une mortalité de 9 % chez le témoin-bonite. Si l'on se base sur la DL 50, on constate que la bonite est entre 15,5 et 26 fois moins toxique que les autres poissons testés.

4 - DISCUSSION

La significativité du test de linéarité chez la bonite indique que son action est multifactorielle, l'un des facteurs étant certainement la présence aux fortes concentrations d'une pellicule huileuse. D'autres facteurs doivent entrer en jeu, car on observe une légère toxicité pour les souris soumises à cet extrait, mais il est probable qu'il ne s'agit pas là de véritable ichthyosarcotisme (BAGNIS et FEVAI, 1970). De toute façon, jusqu'à une concentration approximative de 130 EGM/l (qui correspond à la DL 20), la bonite peut être considérée comme un témoin satisfaisant. Cette dose est 6 fois supérieure à la DL 50 du poisson le moins toxique, et ce large intervalle devrait permettre de faire la discrimination entre poissons toxiques et non toxiques.

Ces premiers résultats sont prometteurs, mais il conviendrait d'améliorer les techniques d'extraction, de manière à obtenir une meilleure miscibilité des extraits et à éliminer ainsi ce qui semble être le principal facteur d'hétérogénéité de nos expériences.

On peut cependant déjà observer que les pentes des droites doses-mortalité des cinq extraits toxiques sont bien plus élevées que lorsque l'on met la même souche de larves d'Ae. aegypti en présence d'insecticides organochlorés. Leurs pentes sont par contre du même ordre que celles obtenues par l'action d'organophosphorés (MOUCHET, comm. pers.), dont le pouvoir inhibiteur de la cholinestérase est bien connu.

Il est à noter enfin que les quantités d'extraits nécessaires pour obtenir 50 % de mortalité pour un bac de 20 larves sont environ 10 fois plus faibles que celles nécessaires pour obtenir une mortalité similaire par injection intrapéritonéale chez la souris (BAGNIS et FEVAI, 1970).

Par contre, aucune mortalité notable chez les larves d'Ae. aegypti n'a été obtenue par l'emploi de doses de tétrodotoxine pure (aimablement fournie par M. SUEHIRO) suffisantes pour tuer 100 pour cent des souris (BAGNIS et PICHON, non publié).

./.....

5 - CONCLUSIONS

- 1 - L'action toxique d'extraits de poissons ciguatérigènes a été mise en évidence sur des larves de moustiques.
- 2 - Les lois dose-mortalité pour les quatre extraits toxiques sont log-normales, ce qui indique que les populations de moustiques utilisées sont homogènes dans leur réponse aux produits employés.
- 3 - La pente des droites représentatives des quatre extraits testés est du même ordre que lorsqu'on expose les larves à divers insecticides organophosphorés, inhibiteurs de la cholinestérase.
- 4 - La méthode employée devrait permettre d'effectuer un véritable dosage biologique du facteur toxique avec une précision et une fidélité satisfaisantes, si l'on parvient à obtenir des extraits davantage purifiés et miscibles. On note en effet pour le témoin-bonite une DL 50 très significativement supérieure à celle observée pour une même quantité de muscles de poissons vénéneux.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier les plongeurs de la Section d'Océanographie Médicale, Messieurs J. BENNETT et F. NANAI, qui ont pêché les poissons toxiques et G. JACQUET qui les a testés sur le chat.

TABLEAU N° 1 - Caractéristiques des extraits utilisés

P O I S S O N				Résultats	Poids du	Poids de	Rendement
Ré-	Nom	Nom	Nom	Test	muscle dés-	l'extrait	de l'extrac-
fé-	Scientifi-	Fran-	Tahi-	Chat	hydraté	liposoluble	tion
ren-	que	çais	tien	(+)	(gr.)	(gr.)	(%)
ce.							
MT1	<u>Scarus</u> sp.	Perro-	Moreo	3	1.000	13,2	1,32
		quet					
MT2	"	"	"	4	1.350	14,7	1,08
MT3	<u>Ctenochae-</u> <u>tus stria-</u> <u>tus</u>	Chirur-	Maito	5	820	8,2	1,00
		gien					
MT5	"	"	"	5	1.000	11	1,10
B1	<u>Katsuwonus</u> <u>pelamis</u>	Bonite	Auhopu	0	2.250	12,5	0,55

(+) : 0 : Absence de signes cliniques
 3 : Paralysie d'un train
 4 : Paralysie des deux trains
 5 : Mort de l'animal

TABLEAU N° 2

Doses létales 50 de chaque extrait, en unités par litre (sans tenir compte de sa valeur réelle, il a été affecté à la concentration de chaque solution-mère une valeur provisoire de 200 unités par litre).

EXTRAIT	DL 50 (u/l)	INT. CONFIANCE P = 0,05	P R E C I S I O N + (%)	
			Inf.	Sup.
MT1	56,13	49,34 - 63,85	6,2	6,6
MT2	25,08	22,78 - 27,74	4,2	5,3
MT3	16,21	13,50 - 19,45	8,7	9,6
MT5	31,12	28,16 - 34,38	4,9	5,1
B1	105,17	89,30 - 123,95 ++	10,9	12,5

+ Exprimée par le rapport de la valeur correspondant à l'écart-type (erreur standard) sur la moyenne.

++ L'intervalle de confiance de B1 n'est donnée qu'à titre indicatif, en supposant que la loi dose-mortalité est normale.

FIG. 1 : Taux de mortalités observés pour les cinq extraits (I = MT1, II = MT2, III = MT3, V = MT5, B = Bonite)

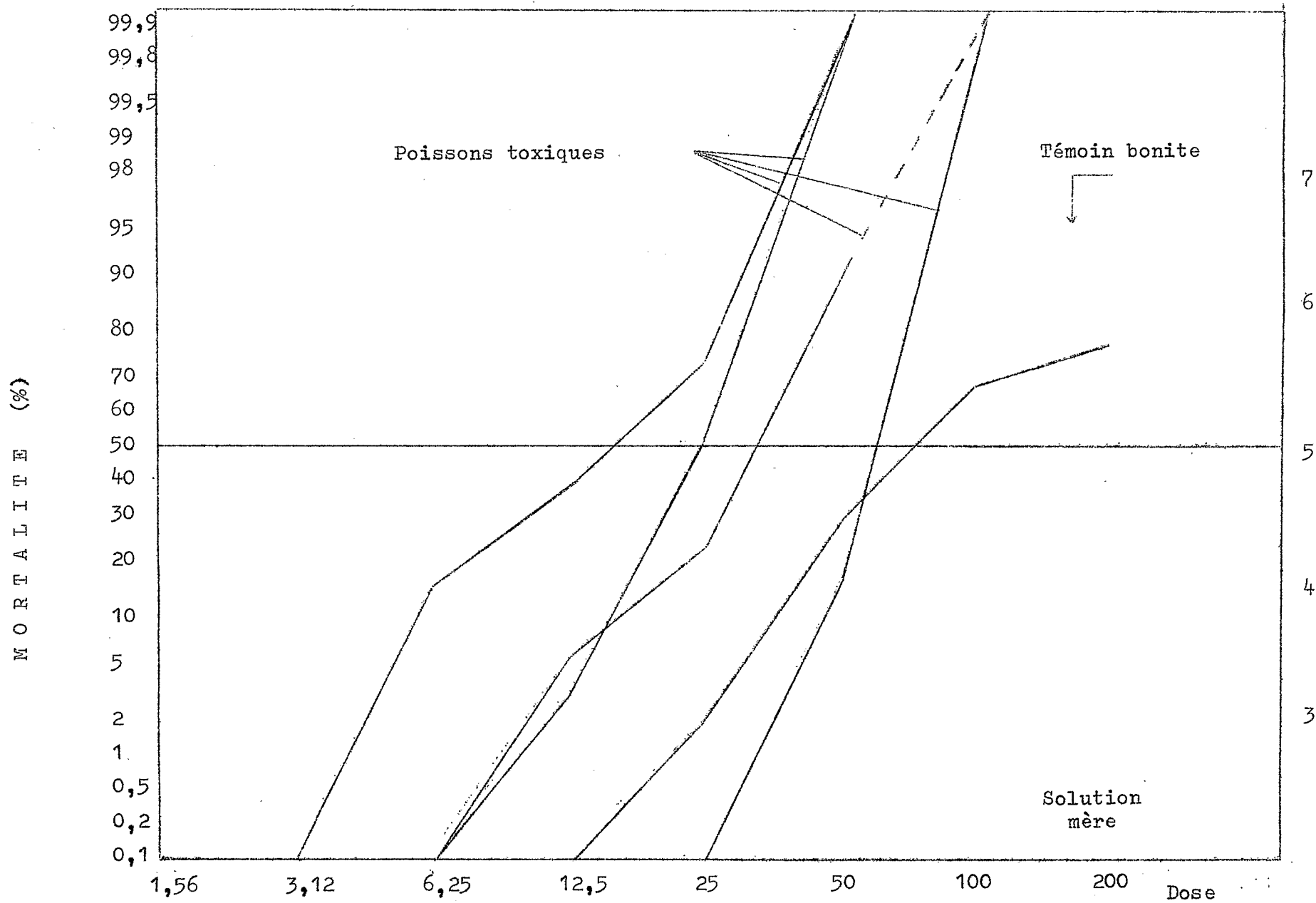
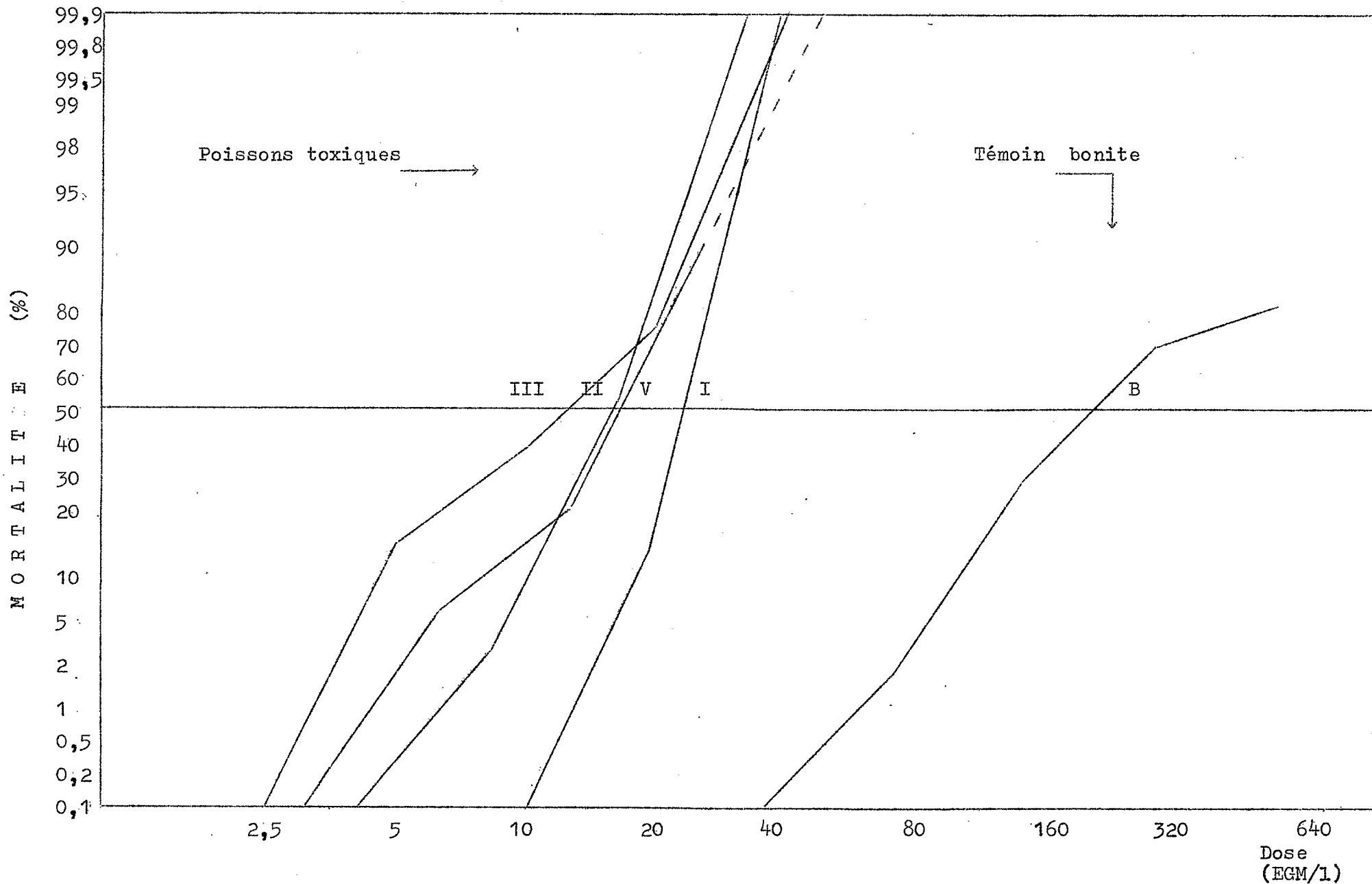
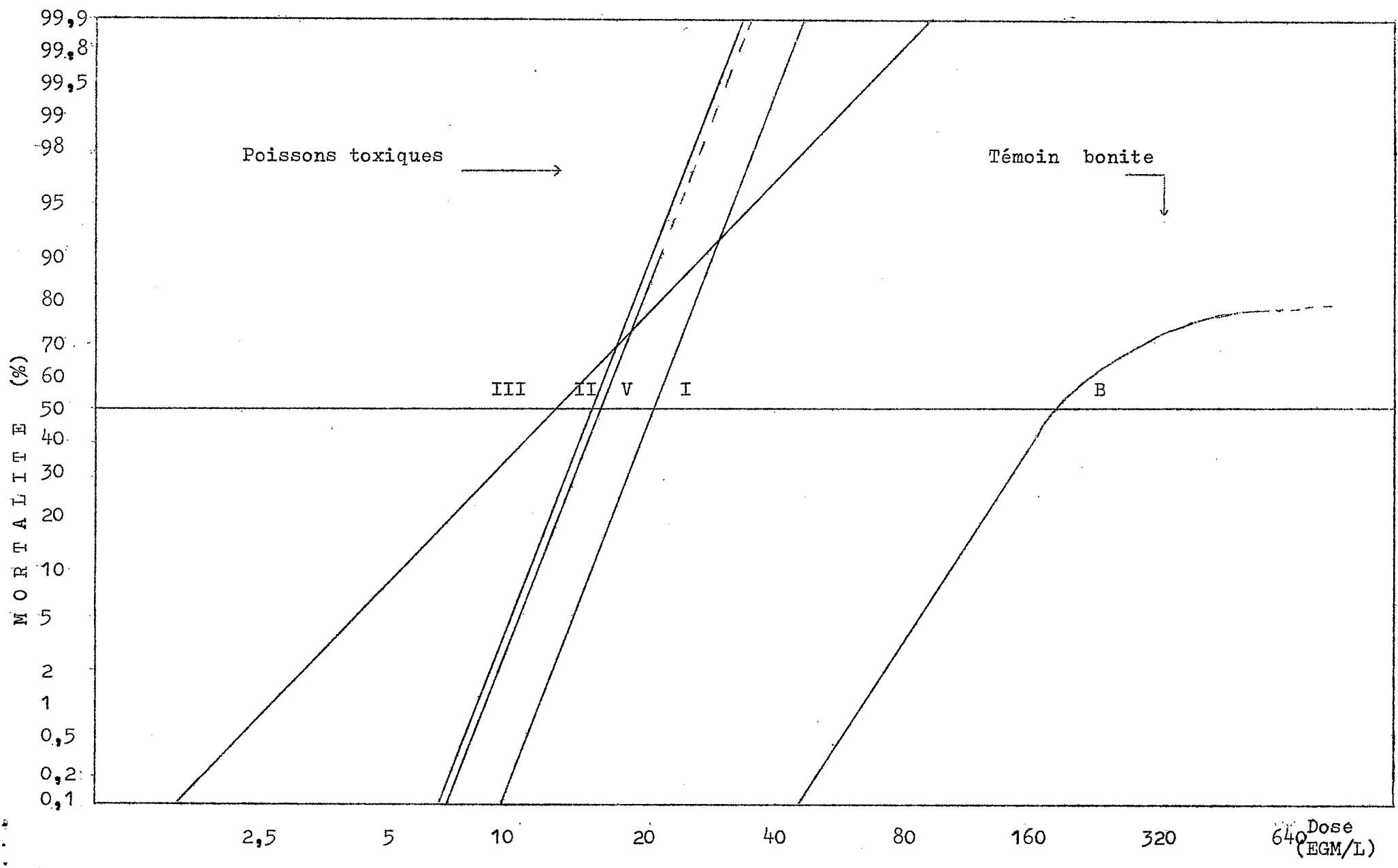


FIG. 2 - Taux de mortalité observés pour les poissons expérimentés



12

FIG. 3 - Taux de mortalité théoriques pour les cinq poissons expérimentés



B I B L I O G R A P H I E

=====

BAGNIS (R.) et FEVAI (G.), 1970 -

Etude comparative préliminaire de la toxicité du muscle de divers poissons ciguatérigènes à l'état brut et des extraits musculaires lipidiques correspondants. Rev. Int. Océanogr. Méd. (en cours de publication).

BROWN (A.W.A.), 1958 -

The World Health Organization test kit for detection of resistance in mosquito larvae. Mosq. News, 18, (2), 128-131.

BROWN (A.W.A.) & PAL (R.), 1971 -

Insecticide resistance in Arthropods. World Hlth Org., monograph. series N° 38, Genève, 498 pp.

CHRISTOPHERS (S.R.), 1960 -

Aedes aegypti (L.) the yellow fever mosquito - Its life history, bionomics and structure. Cambridge University Press, 739 p.

CRAIG (G.B., Jr), 1965 -

The contribution of Aedes aegypti research to the advancement of Biological Science. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 14 (6), 904-908.

OKAICHI (T.) et HASHIMOTO (Y.), 1962 -

The structure of néreistoxin. Agr. Biol. Chem. Tokyo 26 (4) : 224-227.

OKAICHI (T.) et HASHIMOTO (Y.) - 1962 b -

Physiological activities of neréistoxin. Bull. Japan Soc. Sci. Fish. 28 (9) : 930-935 - 1 fig., 1 pl.

O.M.S. - 1960 -

Insecticide resistance and vector control. Org. Mond. Santé, Sér. Rapp. Techn., Genève, 191, 98 pp.

SCHEUER (P.J.), TAKAHASHI (W.), TSUTSUMI (J.) et YOSHIDA (T.), 1967 -

Ciguatoxin : isolation and chemical nature. Science, 155 (3167) : 1267-1268.