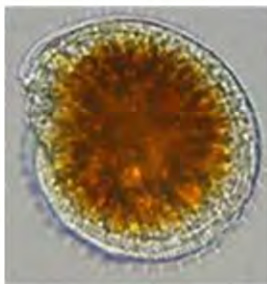


RAPPORT DE STAGE

présenté par

Antoine SIMOND
Promotion 2007 - 2009

Étude de l'implication de cyanobactéries marines benthiques dans une intoxication de type ciguatérique avec transfert à l'homme via les bénitiers.



Pour l'obtention du :

DIPLOME DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR DE LA MER (DTSM)

délivré par :

le Conservatoire national des arts et métiers (Cnam)

Stage placé sous la responsabilité de Dominique LAURENT, CR1
et Anne-Sophie KERBRAT, doctorante.

Effectué du 27 avril au 4 septembre 2009, à :

IRD - Centre de Nouméa
UMR 152 - IRD-Université Paul Sabatier Toulouse III
Laboratoire de pharmacochimie des substances
naturelles et pharmacophores rédox
101, promenade Roger Laroque - Anse Vata
BP A5 - 98 848 - Nouméa Cedex
NOUVELLE-CALÉDONIE

REMERCIEMENTS

La première personne que je tiens à remercier est Dominique LAURENT, mon maître de stage, qui m'a offert la possibilité de réaliser mon stage de fin d'études au sein de l'UMR 152 au centre de l'Institut de Recherche pour le Développement de Nouméa.

La seconde personne que je désire tout particulièrement remercier est Anne-Sophie KERBRAT, doctorante qui m'a très bien accueilli et supervisé durant toute la période de mon stage. Elle a su m'apprendre toutes les manipulations à effectuer de façon à ce que je les découvre et apprenne par moi-même, rapidement et simplement. Elle m'a donc permis de passer un excellent stage dans la bonne humeur et l'allégresse. Encore sincèrement merci pour ta disponibilité (tes corrections aussi !!!) et pour tout ce que tu m'as appris.

Je souhaite aussi remercier Sylvain Petek, chargé de recherche et responsable du laboratoire, pour son amabilité et son accueil.

Merci également à Alain VIDEAULT, Shilpa KUMAR-ROINE et Cyril POULLAIN, pour leur sympathie et leur disponibilité.

Je remercie grandement Amandine, Xavier, Mariko, Lefteri, Sylvère ainsi que l'incroyable bande des Lofteurs pour tous les bons moments passés ensemble qui resteront gravés en moi longtemps.

Je désire remercier mes deux tutrices de stage Martine BERTRAND et Marie-Laure MAHAUT, pour leur suivi du bon déroulement du stage et, leur disponibilité pour répondre à mes quelques requêtes.

Et enfin un grand merci à tout le personnel de l'IRD de Nouméa pour son accueil et tout particulièrement à Marie-Noëlle SEGURA pour m'avoir enlevé mon statut de « SDF » à Nouméa.

SOMMAIRE

Figures	4
Tables	5
Nomenclature	6
Introduction	7
I. Qu'est-ce que la gratte ?	8
1. La ciguatéra	8
2. Les symptômes	10
3. Les toxines	12
4. Les acteurs	17
5. Les causes	18
II. La zone étudiée	20
1. Présentation de la Nouvelle Calédonie	20
2. Lifou	21
3. Zones de prélèvements	22
4. Récapitulatif des missions précédentes	23
III. Matériel et méthode	23
1. Surveillance et prélèvements des échantillons	23
2. Extractions des toxines	26
3. Tests de toxicité	28
IV. Résultats et discussion	34
1. Tests de cytotoxicité sur neuroblastomes de souris	34
2. Tests sur souris	36
3. Surveillance en baie de Prony	36
Conclusion	37
Références Bibliographiques	38
Annexes	40

Figures

Figure 1 : Dessin représentant <i>Gambierdiscus toxicus</i>	8
Figure 2 : Transfert des toxines à travers la chaîne alimentaire	8
Figure 3 : La ciguatéra dans le monde.....	9
Figure 4 : Répartition du temps écoulé entre l'ingestion et l'apparition des premiers symptômes	10
Figure 5 : Classement par ordre décroissant des troubles constatés.....	11
Figure 6 : Structure de la P-CTX-1 du Pacifique	13
Figure 8 : Structure de la maïtotoxine.	14
Figure 7 : Structure de la C-CTX-1 des Caraïbes.....	14
Figure 9 : Structure moléculaire générale des saxitoxines	15
Figure 10 : Position possible de la ciguatoxine sur une membrane cellulaire.....	16
Figure 11 : Photographies de cyanobactéries <i>Hydrocoleum</i>	18
Figure 12 : Photographie de polypes	19
Figure 13 : <i>Ancanthaster planci</i> : étoiles dévoreuses de corail	19
Figure 14 : Carte représentant la Nouvelle Calédonie et sa localisation dans le monde].....	20
Figure 15 : Vue aérienne de la zone d'étude et des points de prélèvement GPS	22
Figure 17 : Photographie d'une <i>Turbinaria</i> spp.....	24
Figure 16 : Photographie d'une <i>Halimeda</i> spp.	24
Figure 19 : Localisation de la baie de Prony	25
Figure 18 : Port de Vale Inco NC dans la baie de Prony	25
Figure 20 : Carte représentant les différents points de prélèvements dans la baie de Prony	25
Figure 21 : Schéma d'une plaque de test de cytotoxicité.....	30
Figure 22 : Graphique des pourcentages de viabilité cellulaire du bénitier B1	32
Figure 23 : Injection d'une souris par voie intrapéritonéale	33
Figure 24 : Représentation du type de courbe que donne la méthode utilisée	34
Figure 26 : Résultat graphique de B11 (1)	35
Figure 25 : Résultat graphique de B6 (1)	35

Tableaux

Tableau 1 : Listes des échantillons prélevés lors de la mission Lifou 15	23
Tableau 2 : Résultats bruts en densité optique d'une plaque	31
Tableau 3 : Extrait du tableau de la première validation	32
Tableau 4 : Extrait du tableau final des résultats	34

Nomenclature

CSSP : Canal Sodium Sensible au Potentiel

CTX(s) : ciguatoxine(s)

DO : densité optique

GC/MS : chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse

GTX(s) : gonyautoxine(s)

HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance

i.p. : par voie intrapéritonéale

IC₅₀ : concentration aboutissant à 50% de mortalité cellulaire (de l'anglais « inhibition concentration »)

ICP : intoxication ciguatérique par les poissons

IDFM : intoxication diarrhéique par les fruits de mer

INFM : intoxication neurologique par les fruits de mer

IPFM : intoxication paralytique par les fruits de mer

MTX(s) : maïtotoxine(s)

PbTX(s) : brevétotoxine(s)

PTX(s) : pectenotoxine(s)

RMN : résonance magnétique nucléaire

STX(s) : saxitoxine(s)

YTX(s) : yessotoxine(s)

Introduction

L'empoisonnement ciguatérique par les poissons ou ichtyosarcotisme (*ichtyos* = poisson, *sarcos* = viande, *toxicon* = poison) est une forme d'intoxication touchant l'homme à la suite de l'ingestion de poissons récifaux (carnivores ou herbivores). Cette intoxication est appelée ciguatéra ou « gratte » car elle provoque une manifestation intense de démangeaisons cutanées généralisées.

La contamination de ces produits de la mer est provoquée par l'ingestion de Dinoflagellés du genre *Gambierdiscus*, algues benthiques unicellulaires. Ce micro-organisme sécrète des toxines qui sont ingérées par les herbivores, elles se transmettent et s'accumulent le long de la chaîne alimentaire et se concentrent jusqu'à obtenir un taux suffisant pour provoquer une intoxication ciguatérique chez l'homme, c'est le phénomène de bioaccumulation dans la chaîne alimentaire. Les toxines majoritaires impliquées dans cette intoxication sont les maïtotoxines (MTXs) et les ciguatoxines (CTXs), qui sont parmi les plus puissantes toxines marines isolées (Chateau-Degat, 2003).

Le Secrétariat général de la Communauté du Pacifique (CPS) a comptabilisé de 3 400 à 4 700 cas par an dans le Pacifique (Laurent D. et al., 2005). Cette intoxication connue depuis toujours constitue un sujet de préoccupation majeure pour les pouvoirs publics français en Polynésie Française essentiellement.

De 2001 à 2005, de nombreux cas d'empoisonnements par des fruits de mer ont été rapportés dans la tribu de Hunëtë à Lifou (Province des îles Loyautés en Nouvelle-Calédonie). Les observations décrites par les données épidémiologiques et cliniques ont montré une apparition rapide de symptômes après consommation de bénitiers ou de poissons de récifs. Le suivi environnemental de la zone a mis en évidence une absence totale du genre *Gambierdiscus* qui est jusqu'à présent le seul agent connu responsable de la ciguatéra. Par contre, une cyanobactérie benthique filamenteuse noire du genre *Hydrocoleum* est présente en grande quantité dans la zone dite toxique et semble être l'organisme responsable de ces cas d'intoxication sévères.

Le sujet du stage s'intègre dans le suivi écotoxicologique de la zone toxique de Lifou. Cela portera donc sur l'étude de la toxicité de bénitiers et de poissons herbivores provenant de la zone toxique de Lifou, afin de continuer le suivi de l'évolution de la toxicité de cette zone. Les toxines provenant des chairs des organismes incriminés seront extraites en utilisant les solvants spécifiques. Enfin, des tests de cytotoxicité sur cultures de neuroblastomes et sur souris seront utilisés afin de déterminer le potentiel toxique des échantillons récoltés lors de la mission « Lifou 15 » effectuée en février 2008.

En parallèle, il y aura une participation à un suivi environnemental dans la baie de Prony, zone d'implantation d'une usine de nickel et de son complexe portuaire qui est actuellement en finalisation. Cette zone offre un terrain propice à l'étude de l'impact écologique sur un écosystème marin. Cette perturbation anthropique peut conduire au développement d'une zone ciguatérique.

I. Qu'est-ce que la gratte ?

1. La ciguatéra

Le nom de ciguatéra a été attribué par l'ichtyologue Poey en 1866 suite à une intoxication neurodigestive fréquente à Cuba et provoquée par l'ingestion d'un petit mollusque gastéropode *Livona picta*, dont le nom vernaculaire est "cigua". Par la suite, il a été étendu au syndrome clinique dû à l'ingestion de poissons coralliens toxiques et au phénomène biologique qui en est à l'origine.

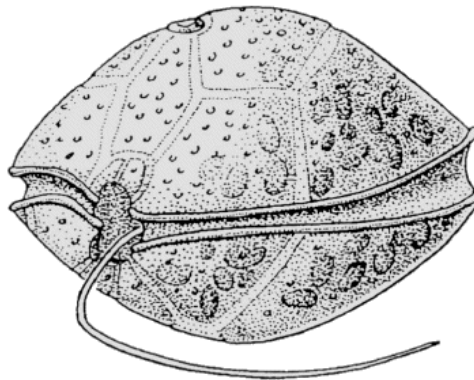


Figure 1 : Dessin représentant *Gambierdiscus toxicus* (grossissement x2000)

<http://pagesperso-orange.fr/aresub/medecinesubaquatique/dangersfaune/ciguatera/gen/fig7a.jpg> [consulté le 06/07/09]

Le principal agent responsable de la ciguatéra fut découvert en 1977 dans les îles Gambier, alors atteintes d'une flambée de toxicité, par l'équipe de Raymond Bagnis de l'Institut Louis Malardé de Papeete (Laurent et al., 2005). Il s'agit d'une algue unicellulaire benthique, *Gambierdiscus toxicus* (Figure 1), qui est ingérée par les poissons herbivores lorsqu'ils broutent les macro-algues qui lui servent de support. Par bioaccumulation le long de la chaîne alimentaire, les toxines initialement produites par la micro-algue vont se concentrer dans les poissons pour atteindre chez les plus âgés et les plus gros des taux susceptibles d'intoxiquer les consommateurs (Figure 2).

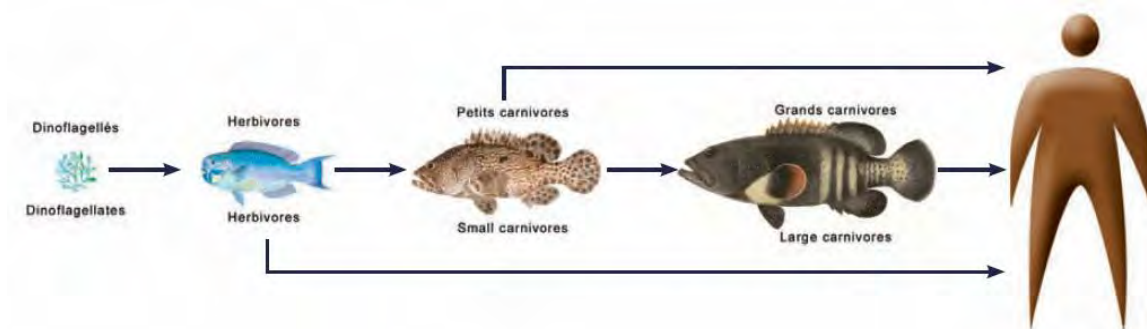


Figure 2 : Transfert des toxines à travers la chaîne alimentaire (d'après Laurent et al., 2005)

En règle générale, tous les poissons des récifs coralliens sont potentiellement toxiques. Cependant, les poissons carnivores en bout de chaîne alimentaire sont susceptibles d'avoir emmagasiné le plus de toxines et sont parmi les plus dangereux : barracudas (*Sphyreanidae*), loches (*Serranidae*), gueules rouges (*Lethrinidae*), anglais (*Lutjanidae*), murènes (*Muraenidae*), requins,

Dans les régions hautement toxiques, les perroquets (*Scaridae*) ou chirurgiens (*Acanthuridae*), poissons à la base de la chaîne alimentaire, sont à consommer avec méfiance. Les poissons du large (thons, tazards du large...) et ceux de profondeur (vivaneaux...) sont très rarement ciguatériques.

Echelle Mondiale

La ciguatera est largement répandue dans l'ensemble des régions intertropicales où l'on trouve du corail ; elle est présente dans tout le Pacifique Sud (Polynésie française, Nouvelle-Calédonie, Australie, Vanuatu, Micronésie, Tokelau, Tuvalu, Mariannes du Nord, Îles Marshall, Îles Cook, Kiribati, Fidji, Tonga et Samoa), dans le Pacifique nord (Hawaï, Japon...), dans l'océan Indien (Île Maurice, Seychelles...), dans les Caraïbes, en Floride, etc. (Figure 3).

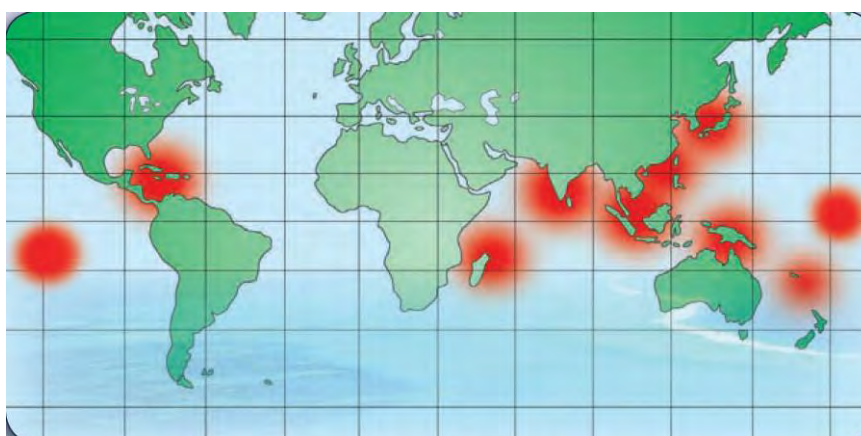


Figure 3 : La ciguatera dans le monde (d'après Laurent et al., 2005)

Avec l'augmentation des exportations de poissons tropicaux vers les marchés des pays du Nord, et avec l'expansion de l'industrie, du tourisme dans les pays tropicaux et intertropicaux, la ciguatera est devenu un phénomène d'intérêt mondial. Cette intoxication touche entre 50 000 et 100 000 individus par an, cela représente donc à la fois un problème de santé publique et une préoccupation d'ordre économique. Les zones principalement touchées restent les régions intertropicales dont les populations consomment les produits de la mer comme source majeure de protéines.

2. Les symptômes

A. Diversité et durée des symptômes

Il existe plusieurs symptômes, qui en général se manifestent entre 30 minutes à 30 heures après l'ingestion du poisson toxique. Mais ce délai reste très variable (figure 4) en fonction de différents paramètres :

- le type, la qualité et la quantité des toxines ingérées
- le poisson consommé (espèce, taille, parties du poisson consommées, position dans la chaîne trophique)
- du consommateur (sensibilité propre, accumulation précédente de CTXs)

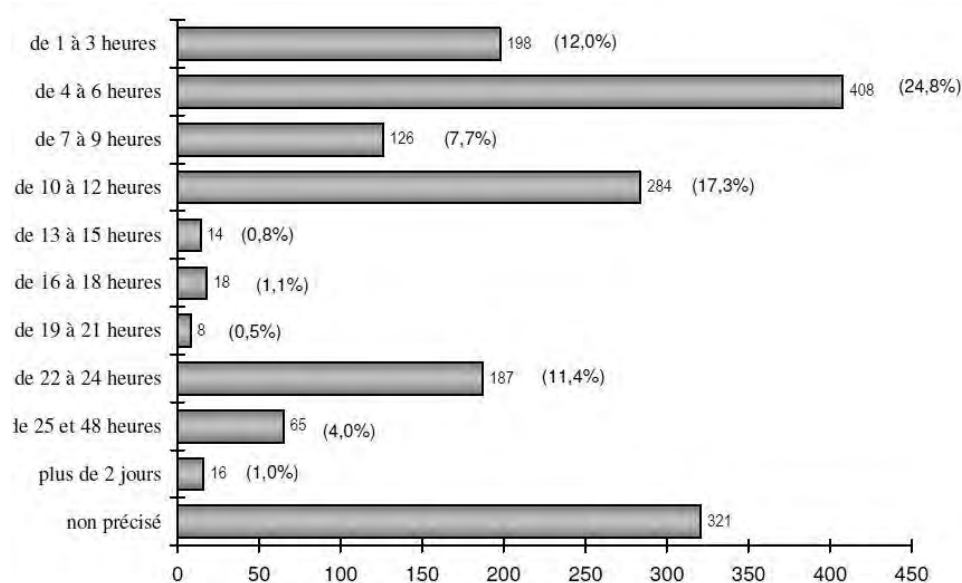


Figure 4 : Répartition du temps écoulé entre l'ingestion et l'apparition des premiers symptômes
(D'après le rapport sanitaire de Nouvelle-Calédonie, 2003)

Les symptômes les plus fréquemment mentionnés sont : « troubles de la sensibilité au contact de l'eau », « picotements et fourmillements des extrémités », « douleurs articulaires et/ou musculaires ». On peut également noter « diarrhées », « maux de tête », « fièvre ou frissons », « crampes » et « goût spécial dans la bouche » (figure 5).

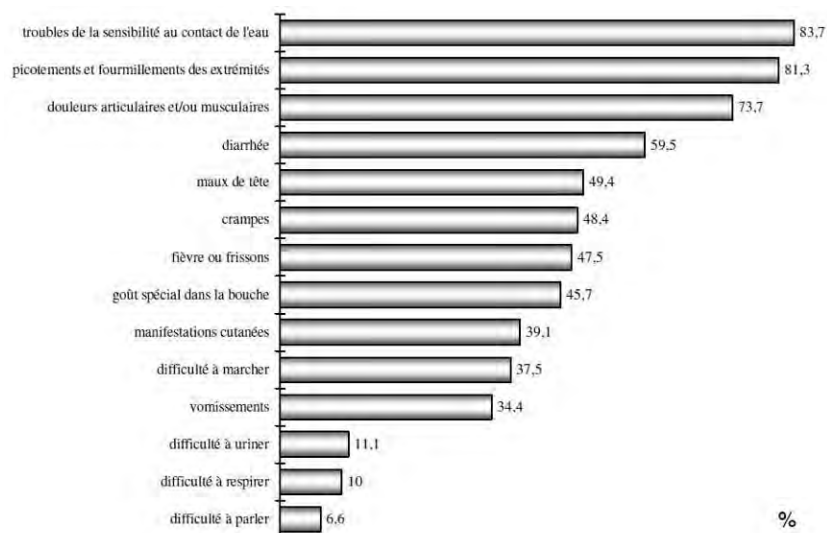


Figure 5 : Classement par ordre décroissant des troubles constatés (% sur 1645 cas)
(D'après le rapport sanitaire de Nouvelle-Calédonie, 2003)

L'ensemble de ces symptômes n'est pas nécessairement présent lors d'une intoxication ciguatérique ; ils apparaissent en fonction de la gravité de l'intoxication. Les différentes catégories de symptômes sont les suivantes :

- **Digestifs** : crampes et douleurs abdominales, vomissements et diarrhée profuse,
- **Neurologiques** : démangeaisons et dysesthésie (inversion des sensations chaud-froid, sensations de brûlures ou de décharges électriques au contact du froid), engourdissement et picotements aux extrémités,
- **Cardiovasculaires** : pouls irrégulier, baisse de la tension artérielle et bradycardie,
- **Généraux** : faiblesse généralisée persistante, douleurs articulaires et musculaires, maux de tête, étourdissements, frissons et transpiration abondante. Le symptôme spécifique de la ciguatera et qui permettra vraiment de différencier une intoxication de ce type d'une intoxication par du poisson mal conservé, par exemple, est *l'inversion des sensations chaud-froid*.

Les fortes intoxications, exceptionnelles, peuvent provoquer des paralysies, le coma et parfois la mort. Celle-ci peut survenir à la suite de la consommation de viscères ou de prédateurs de fin de chaîne alimentaire, comme la murène ou le requin.

Certains symptômes, en particulier ceux à caractère neurologique, peuvent durer plusieurs semaines, voire plusieurs mois. Durant les semaines qui suivent l'intoxication, il est recommandé d'éviter la consommation de poissons ou produits de la mer ainsi que de boissons alcoolisées, de noix ou de graines qui risquent d'accentuer la sévérité de la maladie et sa durée en déclenchant de nouveaux symptômes (annexe 1).

B. Phénomène de sensibilisation

À l'inverse d'un phénomène d'immunisation, il semble qu'il y ait un phénomène de sensibilisation qui pourrait être expliqué (i) par un processus immunologique s'observant notamment au cours des récives; une allergie à la chair de poisson pourrait ainsi s'installer, ou (ii) par l'existence d'un seuil symptomatologique ; le corps se détoxifiant lentement, les toxines s'accumuleraient et, au-delà d'un certain seuil, les symptômes apparaîtraient.

Le contact avec les toxines ne confère donc pas d'immunité. En cas de récive, les symptômes sont amplifiés et peuvent apparaître pour de plus faibles doses de toxines que pour un individu qui a été exempt de tout contact avec les CTXs.

C. Traitement

Il n'existe que peu de traitements soignant cette intoxication, la plupart étant symptomatiques (complexe vitaminique B, anti-diarrhéique, anti-histaminique), même si l'utilisation de substances antagonistes «atropine-like» semble prometteuse. A ce jour, la façon la plus efficace de faire face à cette intoxication est l'utilisation des remèdes la médecine traditionnelle, qui sont basés sur une approche curative et préventive. Ils sont pour la plupart gardés secret.

3. Les toxines

Deux familles de toxines sont impliquées dans l'étiologie de la ciguatera : les maïtotoxines (MTXs) et les ciguatoxines(CTXs).

A. Famille liposoluble

■ Les toxines type ciguatoxine (CTX) :

Les CTXs sont des composés polyéthérés liposolubles (solubles dans les solvants organiques), thermostables (qui résistent donc à la cuisson et à la congélation) et qui résistent aux fortes conditions acides ou basiques. Ces toxines peuvent s'accumuler dans tous les tissus des poissons ou de certains mollusques et sont transférées le long de la chaîne alimentaire. De part leur nature lipidique, l'accumulation sera plus importante dans les viscères, foie ou cerveau que dans les chair, à une concentration estimée à dix fois supérieures. La répartition de ces toxines lipidiques est différente selon les espèces de poissons (Lewis et al., 2005).

Les premières structures chimiques des CTXs ont été découvertes à la fin des années 1980 (Murata *et al.*, 1989 ; Lewis *et al.*, 1991). Une vingtaine de ces toxines ont été isolées de différents poissons : loches (*Plectropomus leopardus* et *Epinephelus polyphekadion*), poissons perroquets (*Scarus gibus*), barracudas (*Sphyraena jello*), murènes (*Gymnothorax javanicus*), etc.

Les toxines produites par les souches sauvages de la micro-algue *Gambierdiscus toxicus*, appelées gambiertoxines, diffèrent également et sont les moins polaires (Legrand *et al.*, 1990 et 1991). Elles sont les précurseurs des CTXs ; elles se transforment en CTX par oxydation à l'aide d'enzymes cytochromes dans le foie des poissons (Legrand *et al.*, 1992). La P-CTX-3B des herbivores serait ainsi un intermédiaire entre les gambiertoxines des microalgues et la P-CTX-IB des poissons carnivores. La toxicité est d'autant plus importante que le degré d'oxydation est élevé. Ainsi les poissons en fin de chaîne alimentaire ont un potentiel toxique plus important. Cependant un niveau d'oxydation ne correspond pas à un niveau trophique. En effet, plusieurs types de CTXs peuvent être présents dans un même poisson. Chaque poisson a donc un profil toxinique spécifique. La ciguatoxine P-CTX-IB est par exemple majoritaire chez les carnivores alors que la P-CTX-3B (moins polaire) est majoritaire chez les herbivores.

Une vingtaine de CTXs a été dénombrée jusqu'à présent et il est fort probable que d'autres CTXs soient identifiées dans les prochaines années. La nomenclature se base premièrement sur le lieu de provenance : les P-CTX (P pour Pacific Ocean), les C-CTX (C pour Carribean Ocean) et les I-CTX (I pour Indian Ocean). Ensuite, l'appellation passe de CTX-3 à CTX-1 en fonction des ressemblances structurales entre les molécules.

■ Exemples de CTXs :

- La ciguatoxine codée **P-CTX-1** est extraite de poissons de l'océan Pacifique. Elle a un poids moléculaire de 1111,6 Dalton et une formule moléculaire $C_{60}H_{86}NO_{19}$ (Yasumoto et Murata, 1990) (Figure 6). Elle est l'une des plus puissantes toxines marines (sa DL_{50} - dose provoquant 50 % de mortalité - est de **0,45 $\mu\text{g/kg}$** en injection intrapéritonéale (i.p.) ou par voie orale chez la souris (Tachibana, 1980). Chez l'homme, la dose moyenne, par voie orale, pour avoir 50 % de consommateurs malades est estimée à 2 ng/kg et la dose létale à 20 ng/kg (soit 1 millième de mg pour une personne de 50 kg). Cette estimation peut varier largement du fait de la sensibilité des individus et de leur propre accumulation de toxine.

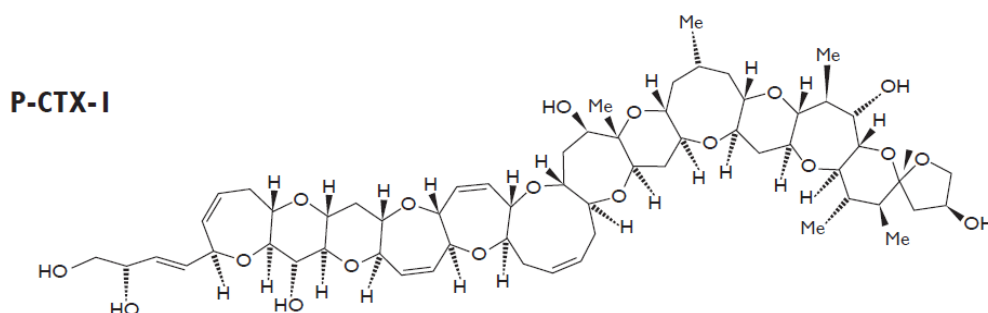


Figure 6 : Structure de la P-CTX-1 du Pacifique (d'après Laurent *et al.*, 2005).

- Un autre type de ciguatoxine a été isolé de *Caranx latus*, un poisson pélagique souvent impliqué dans des intoxications ciguatériques aux Caraïbes. Ces CTXs (C-CTX) sont moins polaires que celles du Pacifique (P-CTX) et ont une toxicité légèrement plus faible. Leurs structures ont été récemment déterminées (Lewis *et al.*, 1998). (Figure 7).

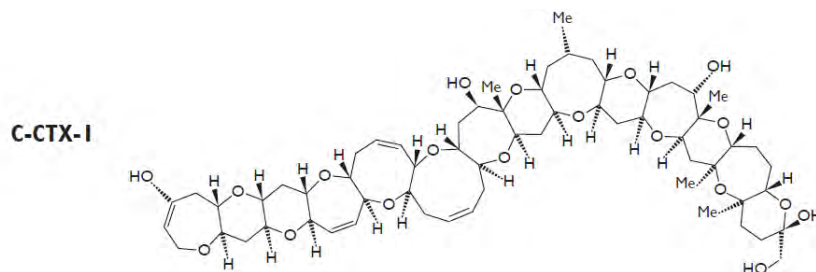


Figure 7 : Structure de la C-CTX-1 des Caraïbes (d'après Laurent et al., 2005).

B. Famille hydrosoluble

a. Les toxines type maïtotoxine (MTX) :

Les maïtotoxines tiennent leur nom du poisson chirurgien *Ctenochaetus striatus* dont le nom vernaculaire est *maïto* en Polynésie Française et à partir duquel le premier type, MTX-1 a été isolé (Yasumo-to *et al.*, 1987).

Les MTXs sont hydrosolubles. Ce sont aussi des polyéthers cycliques, bisulfatés (32 cycles avec un poids moléculaire avoisinant les 3000 Da) (Figure 6) mais elles n'ont pas de parties structurales communes avec les CTXs (Murata *et al.*, 1993). Plusieurs types ont été isolés de cultures de différentes souches de *Gambierdiscus toxicus*.

Ces toxines sont présentes à l'état de trace dans les poissons toxiques, elles interviennent uniquement dans les cas d'intoxication où les poissons sont mal éviscérés.

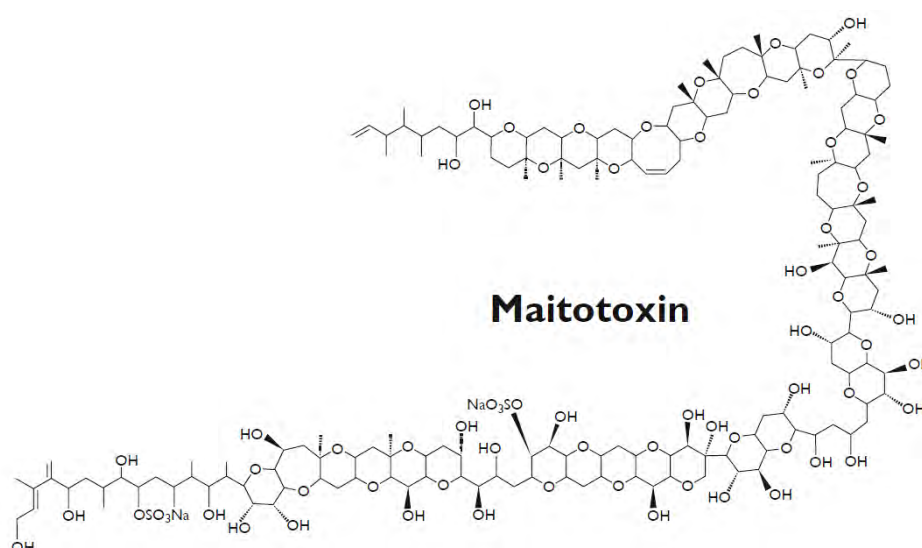


Figure 8 : Structure de la maïtotoxine (d'après Laurent et al., 2005).

Les MTXs sont jusqu'à 100 fois plus toxiques que les CTXs par voie i.p. chez la souris (DL_{50} de **0,13 $\mu\text{g/kg}$**) et 100 fois moins toxiques par voie orale (Yokohama et al., 1988). L'implication directe des MTXs dans le phénomène de la ciguatera n'est pas certaine ; chez les poissons, elles sont limitées aux herbivores et aux brouteurs (Laurent et al., 2005).

b. Les toxines type saxitoxine :

Les saxitoxines (STXs) sont des toxines qui sont majoritairement synthétisées par des dinoflagellés du genre *Alexandrium*, *Gymnodinium* ou *Pyrodinium*. Des cyanobactéries ainsi que certains coquillages peuvent également en produire (Ifremer, 2006). Les STXs provoquent des effets paralysants. C'est la première phycotoxine paralysante identifiée, après avoir été isolée d'un clam appartenant à l'espèce *Saxidomus giganteus* (Ifremer, 2006).

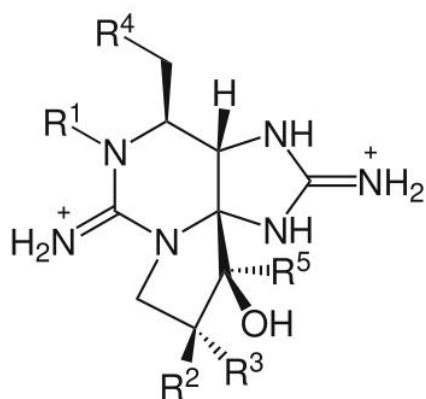


Figure 9 : Structure moléculaire générale des saxitoxines (AFSSET, 2006).

Cette famille de phycotoxines de type alcaloïdes possède un noyau tétrahydropurique sur lequel il peut y avoir plusieurs substitutions générant plus de vingt-cinq variantes dont la structure générale est présentée en figure 9. Le poids moléculaire des STXs varie de 241 et 491 Da (AFSSET, 2006). Elles sont hydrosolubles, thermostables et stables en milieu acide et chacune d'entre elles possèdent ainsi une stabilité et une toxicité propre. Par contre, ces toxines sont fragiles en milieu alcalin et sensibles aux oxydants (Ifremer, 2006).

C. Le mode d'action des toxines

a. Ciguatoxines :

Les CTXs sont des neurotoxines modifiant la perméabilité de la membrane cellulaire aux ions sodium. Elle ouvre les canaux sodium sensible au potentiel de membrane (CSSP), ce qui entraîne un afflux de sodium intracellulaire et une dépolarisation de la fibre nerveuse (Capra *et al.*, 1985). Les CSSP jouent un rôle clé dans la propagation des potentiels d'action et donc dans le transfert de l'information dans les nerfs et les muscles. La très large distribution de ces canaux dans les tissus nerveux et musculaires peut expliquer la variété des effets provoqués par les CTXs chez l'homme.

Les CTXs agissent sur un des sites protéiques des CSSP, (le site 5) : l'activation de ce site provoque l'ouverture de ces canaux. La CTX pourrait se positionner entre la membrane lipidique et la partie protéique du canal sodium (Gillespie *et al.*, 1986) (figure 10). Elle traverserait cet ensemble lipide-protéine en acquérant un haut degré de stabilité.

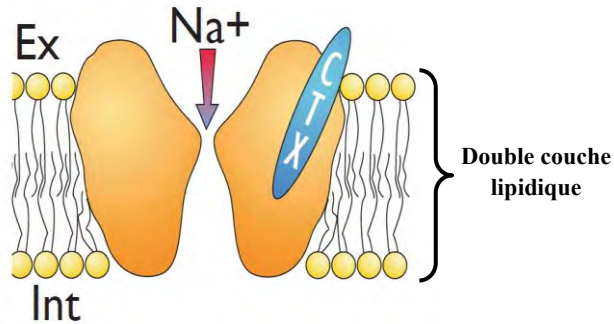


Figure 10 : Schéma représentant une position possible de la ciguatoxine sur une membrane cellulaire (d'après GILLEPSIE et al., 1986)

La figure 10 nous montre une section du complexe protéique d'un canal sodium qui traverse la membrane cellulaire (double couche lipidique), avec une position possible de la ciguatoxine. Le canal est montré dans un état de non-conduction dans lequel il se trouve généralement lorsque le potentiel de membrane est au repos.

La dépolarisation de la membrane qui résulte de l'influx de sodium entraîne également l'ouverture des canaux calciques et donc un influx de calcium qui active la libération de neuromédiateurs sympathiques (noradrénaline) et parasympathiques (acétylcholine) (Laurent et al., 2005).

Les études pharmacologiques *in vivo* ont montré que les CTXs provoquaient la mort en bloquant la conduction nerveuse phrénique, causant ainsi un arrêt respiratoire. L'administration de CTXs chez l'animal peut aussi induire des symptômes cardiovasculaires plus ou moins marqués, résultant dans un premier temps d'effets cholinergiques (bradycardie, hypotension) et ensuite d'effets adrénergiques (tachycardie, hypertension) (Lewis, 1988).

b. Maïtotoxines :

Les MTXs sont des neurotoxines dont les effets sont centrés sur les canaux calcium (Lewis *et al.*, 2000). Elles provoquent une plasmolyse des cellules par une accumulation lente et progressive de calcium. Les études neurophysiologiques montrent que les MTXs causent un effet inotrope positif (augmentation de la contractilité) sur le muscle lisse, suggérant que ce type de toxine provoque un accroissement de la perméabilité aux ions calcium, probablement à travers les canaux calcium (Ohizumi, 1987).

c. Saxitoxines :

Les STXs inhibent l'influx nerveux au niveau des axones des neurones en bloquant le passage des ions sodium à travers les canaux sodiques au niveau des cellules excitatrices (nerveuses et musculaires). Ceci résulte en une inhibition du mécanisme de dépolarisation et de la transmission nerveuse. L'organisme infecté souffre de paralysie et de déficience respiratoire provoquant ultimement la mort (AFSSET, 2006).

4. Les acteurs

A. Les dinoflagellées

Les dinoflagellés sont des algues unicellulaires, constituant du phytoplancton et aliment pour les poissons et les coquillages ; elles constituent la base de la chaîne alimentaire. Certaines espèces sont capables, dans des conditions environnementales et climatiques particulières, de proliférer en masse (apparition des célèbres marées rouges) et/ou de produire des toxines (ou phycotoxines). Ces efflorescences toxiques touchent des milliers de personnes chaque année et sont responsables de syndromes que l'on peut classer selon leurs symptômes :

- **Le syndrome diarrhéique** (ou IDFM pour Intoxication Diarrhéique par les Fruits de Mer), provoqué par deux dérivés méthylés de l'acide okadaïque et trois pectenotoxines (PTXs) synthétisées par les dinoflagellés du genre *Dinophysis* et *Prorocentrum*. Une nouvelle toxine de ce groupe, la yessotoxine (YTX) a été récemment identifiée chez les moules norvégiennes ;
- **Le syndrome paralysant** (IPFM pour Intoxication Paralytique par les Fruits de Mer), dû à une vingtaine de dérivés de la saxitoxine (STX) et aux gonyautoxines (GTXs) ;
- **Le syndrome neurotoxique** (ou INFM pour Intoxication Neurologique par les Fruits de Mer) provoqué par les brevétotoxines (PbTXs) de *Ptychodiscus brevis* (actuellement *Gymnodinium breve*). Elles sont à l'origine de la mort massive de poissons ainsi que d'intoxications humaines, qui peuvent directement être causées par l'inhalation des toxines apportées par le vent de mer soufflant lors des marées rouges de microalgues. *Chrysochromulina polylepis* est aussi à l'origine d'eaux colorées spectaculaires, mais produit des toxines hémolytiques ;
- **Le syndrome ciguatérique** (ou ICP pour Intoxication Ciguatérique par les Poissons) détaillé précédemment.

B. Les cyanobactéries

Ces procaryotes, unicellulaires ou pluricellulaires, ont longtemps été inclus dans les “algues” et nommés algues bleues en raison, en particulier, de leur habitat aquatique et de leur coloration bleu-vert. Il est actuellement admis que leur ultra-structure, de type procaryote, indique une parenté certaine avec les bactéries, justifiant le terme de cyanobactéries qui leur est désormais appliqué. Près de 150 genres, correspondant à environ 1 500 espèces ont été signalés dans le monde dont un grand nombre est d'origine marine. Plus de 50 genres comprenant 200 espèces sont cités pour les côtes d'Europe dans le travail de Frémy (1934).

Ces organismes ont une grande importance dans l'écosystème marin. Ils peuvent être planctoniques mais ils sont surtout benthiques et abondants dans les étages médiolittoral et infralittoral. Ils forment en particulier une ceinture souvent très nette dans la partie supérieure de l'étage médiolittoral et jouent un grand rôle sur les côtes calcaires en raison de leur mode de vie endolithe. Enfin, ils sont aussi fréquemment épiphytes; à ce titre, ils sont consommés par les animaux brouteurs et interviennent potentiellement dans le phénomène de la ciguatera (Delépine et al., 2002).



Figure 11 : Photographies de cyanobactéries *Hydrocoleum gutinosum* et de *Hydrocoleum lyngbyaceum* vue au microscope (haut à gauche)

En 2008, il a été démontré pour la première fois, la potentielle implication de cyanobactéries marines benthiques toxiques du genre *Hydrocoleum* spp.(figure 11) dans une intoxication affectant l'homme, avec des symptômes similaires à ceux de l'ICP. Ces cas d'intoxication ont été causés par la consommation de bénitiers (*Tridacna* sp.) ou de poissons (principalement des brouteurs et des molluscivores) pêchés en zone récifale (Laurent et al., 2008).

5. Les causes

Suite à un stress l'écosystème corallien peut être perturbé, le corail se dégrade et les zones récifales ainsi affectées offrent un substrat propice au développement des micro-organismes toxiques. Ces facteurs ciguatérigènes réunis, l'apparition d'une zone ciguatérique devient alors un risque.

A. Les coraux

Le corail est un animal hermatypique, c'est-à-dire bâtisseur de récifs du groupe des madréporaires ou scléactinaires se présentant sous de multiples formes : encroûtant, massif, colonne, ramifié, foliacé, C'est un polype vivant généralement en colonies d'individus et construisant tout au long de leur vie un squelette extérieur à partir de minéraux présents dans l'océan.

Ces polypes, formant la partie vivante de ces organismes qui se logent à l'intérieur des creux calcaires qu'ils élaborent grâce à leur symbiote, des microalgues photosynthétiques, les zooxanthelles.



Figure 12 : Photographie de polypes

(<http://saltwater-aquarium-guide.net/images/bonaire-flower-coral.jpg>) [consulté le 17/08/09]

B. Le stress

Le stress peut affecter les coraux de deux manières différentes : soit une destruction mécanique ou le blanchiment du corail. Ces perturbations peuvent être classées comme suit :



**Figure 13 : *Acanthaster planci* :
étoiles dévoreuses de corail**

(http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3f/Acanthaster_planci_%C3%A9toiles_mangeuses_de_corail.jpeg) [consulté le 16/07/09]

- *Destruction naturelle* : raz de marée, tsunami, tempêtes, cyclones, l'effet El Niño, séismes sous-marins, sources d'eau douce, *Acanthaster planci*, ...

- *Destruction anthropique* : travaux d'aménagement des littoraux, avec parfois utilisation des coraux pour les constructions et formation de nuages de boues privant les zooxanthelles de lumière, modification des paramètres biogéochimiques, pêche intensive, pêche à la dynamite ou au cyanure, tourisme irresponsable, rejets de déchets en mer, activités militaires, ...

- *Réchauffement climatique* : il provoque une hausse de la température des mers (le corail souffre à partir de 29°C et meurt au-delà de 30°C) et la surexposition aux rayonnements ultra-violet due aux trous dans la couche d'ozone pourraient également participer à la destruction des récifs.

C. Conséquences

Ces surfaces coralliennes nouvellement dégradées vont progressivement être recouvertes par des gazons algaux constitués de macroalgues sur lesquelles vont à leur tour proliférer des microalgues. On estime que le délai entre la perturbation du milieu corallien et l'apparition de cas de ciguatéra est de l'ordre d'une vingtaine de mois : deux à trois mois pour que les surfaces coralliennes nouvellement mises à nu soit recouvertes de gazons algaux, quatre mois avant que les premiers dinoflagellés soient observés, huit à neuf mois avant que ceux-ci n'atteignent une densité conséquente et encore au moins trois mois pour que soient décrits les premiers cas d'intoxications humaines; soit, au total, un délai d'un an et demi à deux ans (Caire et al., 1985). En l'absence d'entretien du phénomène, l'épidémie dure de dix à trente ans.

II. La zone étudiée

1. Présentation de la Nouvelle Calédonie

La Nouvelle-Calédonie est un archipel d'Océanie situé dans l'océan Pacifique à 1 500 km à l'est de l'Australie et à 1 700 km au nord de la Nouvelle-Zélande, à quelques degrés au nord du Tropique du Capricorne (figure 14). Elle est distante de la France de près de 18 400 kilomètres et possède une superficie de 19 580 km².

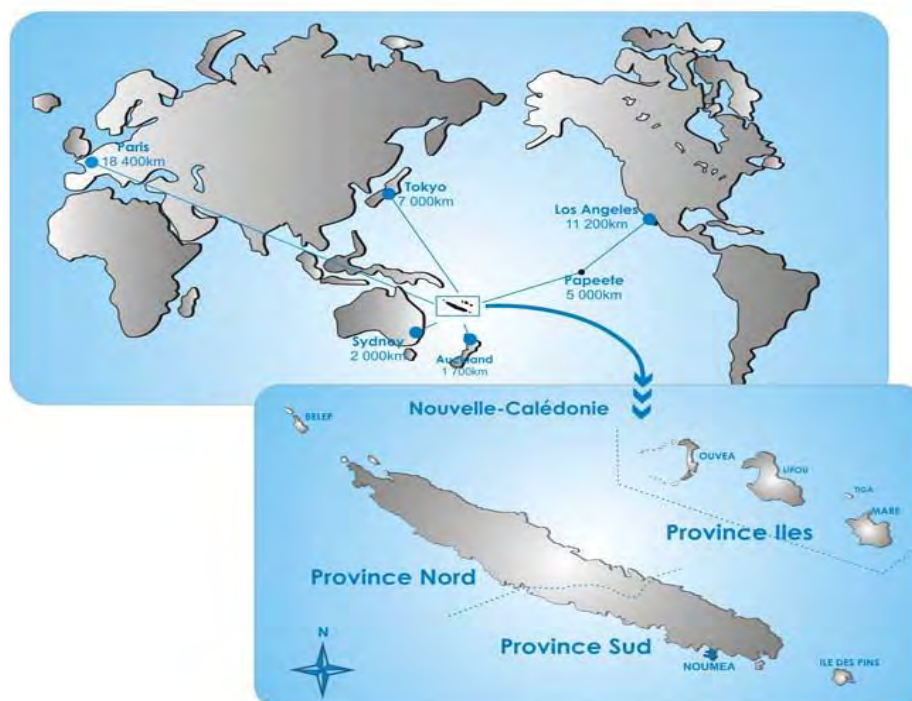


Figure 14 : Carte représentant la Nouvelle Calédonie et sa localisation dans le monde
(<http://www.echo-fle.org/Portals/1/Fiches/643/image004.jpg>) [consulté le 07/06/09]

A. Des îles

La Nouvelle-Calédonie est centrée autour d'une île principale, la Grande Terre. Elle comprend également plusieurs ensembles d'îles plus petites, les îles Belep au Nord de la Grande Terre, l'île des Pins au Sud, les îles Loyauté à l'Est (Ouvéa, Lifou, Tiga et Maré) et plus loin à l'Ouest l'archipel des îles Chesterfield et les récifs de Bellone.

Sur une superficie d'environ 16 360,8 km², la Grande Terre est de loin la plus grande de toutes les îles néo-calédoniennes. Elle s'étire du Nord-Ouest au Sud-Est sur près de 400 km en longueur et 50 à 70 km en largeur. Elle est parcourue sur toute sa longueur par une chaîne montagneuse, dont le point culminant, le mont Panié, s'élève à 1 629 mètres d'altitude. Les îles Loyauté sont situées à une centaine de kilomètres à l'Est. Lifou est la plus vaste de ces îles (plus étendue que la Martinique), viennent ensuite Maré, Ouvéa et Tiga.

B. Les lagons

Le lagon néo-calédonien a une surface totale de 24 000 km², ce qui en fait l'un des plus grands lagons du monde. Il est ceinturé par une barrière de corail d'une longueur de 1 600 km, située entre 10 et 50 km des côtes de la Grande Terre, et s'étendant, des récifs d'Entrecasteaux au Nord-Ouest à l'île des Pins au Sud-Est, sur 680 km de long. La température des eaux varie entre 22 et 30°C durant l'année.

En dehors de la Grande Terre, plusieurs atolls possèdent leurs propres lagons, le plus important d'entre eux étant Ouvéa avec un lagon de 850 km². Le 7 juillet 2008, une grande partie des lagons de Nouvelle-Calédonie, soit 6 sites formant une totalité de 15 000 km², ont été inscrits au patrimoine mondial de l'UNESCO. La Nouvelle-Calédonie se distingue notamment par une biodiversité d'une étonnante richesse et originalité. Le taux d'endémicité est le plus élevé au monde.

2. Lifou

Lifou est l'île, la plus importante des îles Loyauté par sa superficie. Comme ses voisines Maré et Ouvéa, Lifou est constituée de roches calcaires massives d'origine corallienne : c'est un ancien atoll progressivement soulevé au cours des âges. Lifou présente donc un large plateau central, correspondant au fond de l'ancien atoll (le reste desséché de son lagon), entouré par une couronne de falaises correspondant à l'ancienne barrière récifale.

Du fait de son substrat calcaire très poreux, Lifou est dépourvue de cours d'eau, mais elle renferme une importante lentille d'eau douce en profondeur. Cette lentille est accessible par des trous d'eaux, qui jouent un rôle important dans la mythologie locale. Lifou est donc entourée de zones coralliennes au long de ses côtes.

3. Zones de prélèvements

L'étude réalisée est située sur la zone traditionnelle de pêche de la tribu de Hunëtë qui se trouve au Nord-Ouest de Lifou, dans le district de Wetr.

L'étude épidémiologique menée auprès de la population a permis de définir deux zones de pêche contigües dont l'une est toxique et l'autre non toxique : afin de détudier ces deux zones, trois transects par zone sont délimités :

- 3 dans la zone non toxique (n°1, n°2, n°3)
- 3 dans la zone toxique (n°4, n°5, n°6)

Ensuite, trois transects transversaux distants d'environ 50m ont permis de définir trois points d'éloignement de la côte : A, B et C (Figure 15).

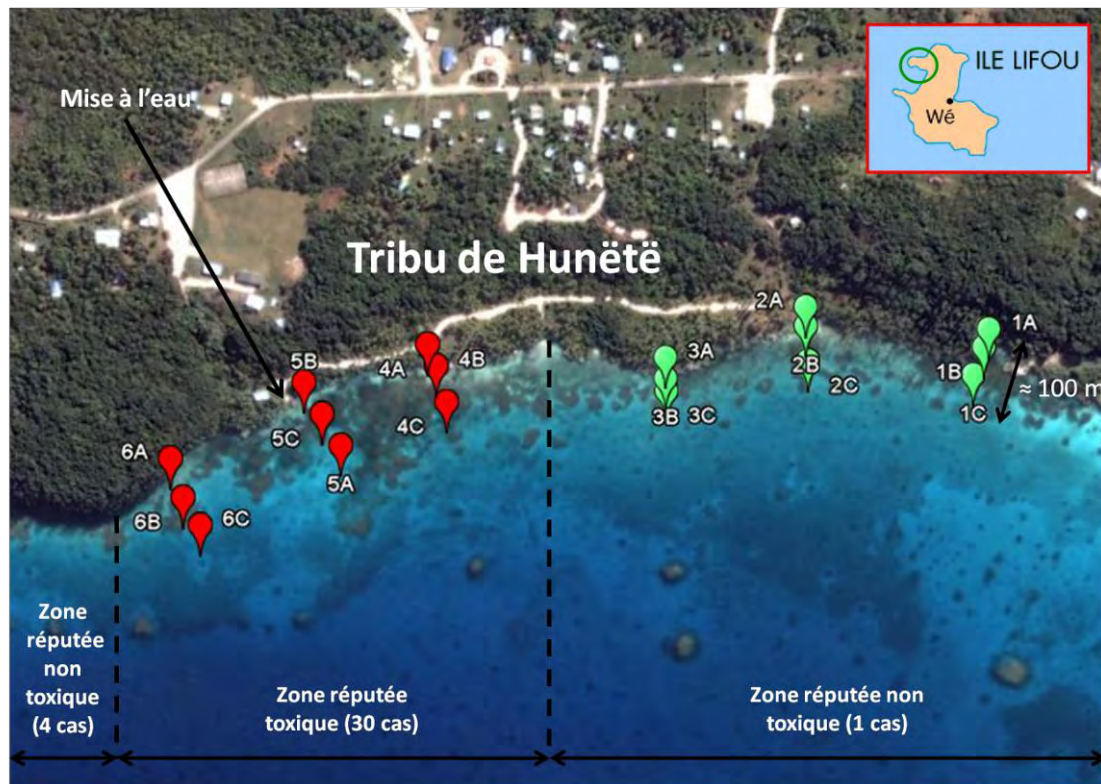


Figure 15 : Vue aérienne de la zone d'étude et des points de prélèvement GPS

Six bénitiers sont prélevés sur chaque zone. Ce suivi temporel est effectué depuis 2005 sur l'écosystème corallien de la zone. Jusqu'à présent, 15 missions ont été effectuées, à raison de 3 à 4 par années : 1 mission de prélèvement et 2 à 3 missions d'observations de l'écosystème. L'objectif de ce suivi est :

- l'étude de la diversité, de la densité et de la toxicité de des microalgues responsables de la ciguatera
- l'analyse de la toxicité de la chaîne trophique (poissons et bénitiers).

4. Récapitulatif des missions précédentes

Suite aux analyses chromatographiques (HPLC) effectuées sur des extraits purifiés de bénitiers, la présence d'un pic de rétention proche d'un pic caractéristique de la P-CTX-3 a pu être détectée. Ceci laisse donc supposer la présence de CTXs dans les bénitiers. Ensuite, des tests électrophysiologiques sur axones de grenouilles ont permis d'indiquer la présence de toxines paralysantes de type anatoxines-a dans des extraits traités de cyanobactéries. Cette toxine a également été identifiée par chromatographie (GC/MS) (Laurent et al, 2008).

La détection de CTXs dans des extraits traités de bénitiers, l'observation de cyanobactéries sur le terrain, ainsi que la présence d'anatoxine-a dans les extraits traités des cyanobactéries, ont conduit à envisager un nouveau schéma de transmission impliquant à la fois les CTXs et des toxines paralysantes responsables d'IPFM. Le phénomène observé est semblable au phénomène de la ciguatera, mais en diffère par quelques aspects comme la sévérité des symptômes, l'implication des bénitiers et de poissons herbivores, d'où son nom de « ciguatera-like ».

III. Matériel et méthode

1. Surveillance et prélèvements des échantillons

A. Échantillons

En février 2009 (saison chaude), une mission d'observation et de prélèvements de poissons, bénitiers et cyanobactéries a eu lieu : la mission « Lifou 15 » (L15). Le tableau 1 nous montre les échantillons prélevés lors de la mission :

Zone réputée toxique	Zone réputée non toxique
- 6 bénitiers - 6 poissons perroquets - Cyanobactéries benthiques	- 6 bénitiers - 3 poissons perroquets - Cyanobactéries benthiques

Tableau 1 : Listes des échantillons prélevés lors de la mission Lifou 15

B. Prélèvements

a. Pour l'analyse de la toxicité :

Les poissons sont pêchés au fusil de chasse sous-marine par des habitants de la tribu de Hunëtê. Les bénitiers et les cyanobactéries sont ramassés sur les fonds en plongée libre.

Pour les bénitiers, l'ensemble du corps est prélevé et pour les poissons, les filets et les foies. Quant aux cyanobactéries, elles sont mises dans des bocaux avec de l'eau de mer. Tous les échantillons sont conservés à -20°C en attendant les analyses au laboratoire.

Un prélèvement de cyanobactéries est stabilisé au Formaldéhyde à 3% en eau de mer pour le conserver et permettre les observations microscopiques.

b. Pour l'observation des micro-organismes :

Pour *Gambierdiscus* spp., depuis qu'il a été découvert que ce sont des microalgues épiphytes (Adachi and Fukuyo, 1979) qui poussent généralement sur diverses macroalgues hôtes, il a été possible de mettre au point un test rapide (Yasumoto *et al.*, 1979), consistant à agiter les algues hôtes pour en détacher les dinoflagellés afin de les dénombrer. Cette méthode permet d'obtenir un schéma de répartition des dinoflagellés sur les récifs, et, donne des éléments d'explication sur la présence de poissons récifaux ciguatoxiques.

Cette méthode est très simple et relativement peu coûteuse à mettre en œuvre (annexe X). Elle se décompose en trois étapes:

1. Prélèvement d'échantillons d'algues brunes (Figure 16 et 17).
2. Extraction des cellules de dinoflagellés des algues hôtes par agitation.
3. Comptage des cellules au microscope et estimation des densités.

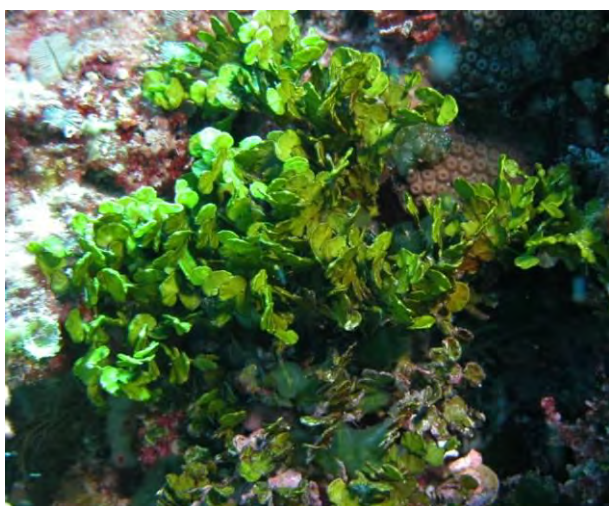


Figure 16 : Photographie d'une *Halimeda* spp.

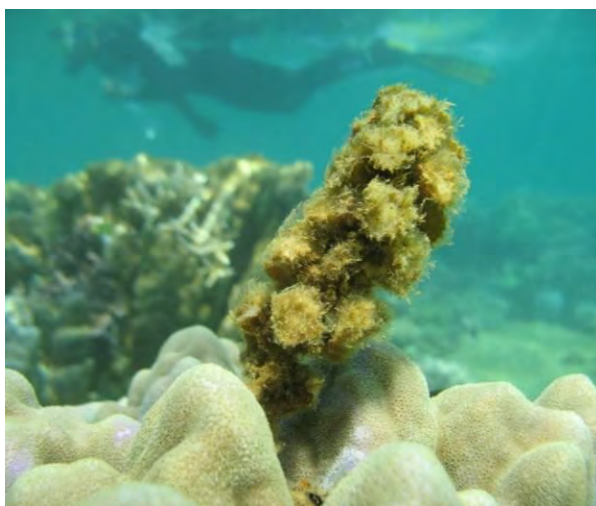


Figure 17 : Photographie d'une *Turbinaria* spp.

C. Surveillance de la baie de Prony

Lors de mon stage, j'ai participé en parallèle, à un suivi écotoxicologique dans la baie de Prony, qui est située au sud de la Nouvelle-Calédonie (Figure 19). J'ai effectué deux missions de surveillance sur le terrain.



Figure 18 : Port de Vale Inco NC dans la baie de Prony



Figure 19 : Localisation de la baie de Prony

Cet endroit est intéressant, car c'est une zone impactée par la construction récente d'un port (Figure 18) pour Vale-Inco NC, une entreprise exploitant le nickel, mais aussi d'un tuyau sous-marin de rejet d'effluents. Le but est donc d'identifier les facteurs favorisant les zones ciguatérigènes, en mettant en place un suivi écotoxicologique. Le suivi spatial et temporel de la présence de *Gambierdiscus* spp. et de cyanobactéries permet de caractériser le développement d'une zone ciguatérigène.

Depuis 2005, une fois par an, une analyse de la ciguatoxicité de la chaîne pisciaire est effectuée en prélevant des poissons aux différents maillons de la chaîne. Le reste de l'année, une surveillance de la présence de *Gambierdiscus* spp. est effectuée tous les mois en saison chaude et tous les deux mois en saison fraîche, selon la méthodologie détaillée précédemment pour l'étude de la zone de Lifou. Afin d'encadrer au mieux la zone potentiellement impactée par l'usine, les points de prélèvements indiqués ci-dessous ont été choisis (figure 20).

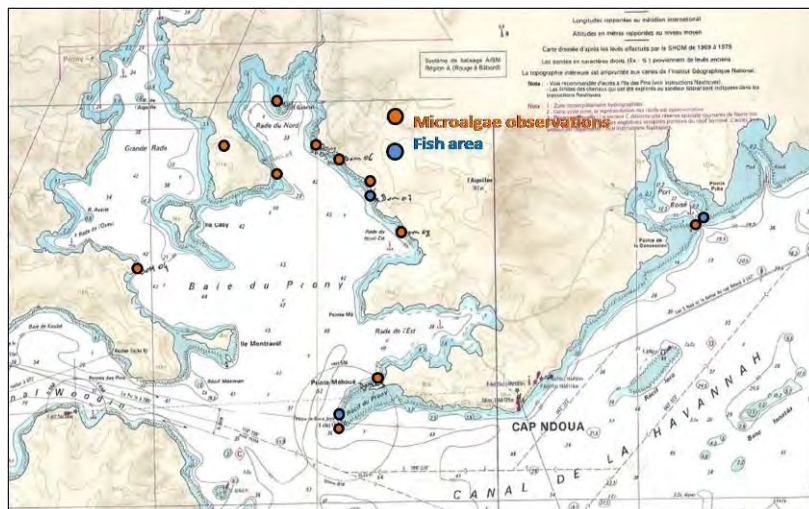


Figure 20 : Carte représentant les différents points de prélèvements dans la baie de Prony

2. Extractions des toxines

Il y a deux types d'extraction qui ont été utilisés durant mon stage. Une extraction dite rapide, qui est utilisée spécifiquement pour isoler les CTXs déjà connues. En revanche, l'extraction de masse est utilisée particulièrement avec les bénitiers ou les cyanobactéries car les toxines qui sont recherchées ne sont pas encore identifiées. Il permet donc de séparer plus généralement les toxines liposolubles et hydrosolubles.

A. Extraction rapide

L'extraction rapide est effectuée en vue du dosage des CTXs par test de cytotoxicité sur neuroblastomes. Le protocole a été mis au point par l'Institut Louis Malardé de Tahiti, en 2000, et validé par des tests souris et des tests RBA (Radioligand Binding Assay).

a. Principe

Cette extraction permet d'isoler d'un échantillon, la fraction susceptible de contenir des MTXs et la fraction susceptible de contenir des CTXs, en se servant de la différence de polarité des deux types de toxines connues. Le principe de la chromatographie est utilisé. La phase mobile est constituée de solvants de polarité décroissante et la phase stationnaire, d'une colonne de silice en phase inverse : la cartouche retient les CTXs qui sont plus hydrophobes que les MTXs et sont ensuite éluées par une phase mobile moins polaires.

b. Méthode

- ***Préparation des échantillons***

Après avoir prélevé l'intégralité de la chair de poisson (filet) et des bénitiers, l'ensemble du matériel biologique est broyé à l'aide d'un mixeur pour une bonne homogénéisation de la matière. Trois aliquots de 5g sont prélevés dans des tubes de 50mL. Les échantillons sont conservés à -20°C jusqu'à l'étape d'extraction.

- ***Extraction***

Un volume de 7mL de méthanol (MeOH) à 100% est ajouté à chacun des aliquots. Les échantillons sont agités mécaniquement, incubés dans un bain à ultrason pendant 2hrs, puis maintenus à -20°C pendant 12hrs. Les échantillons sont ensuite centrifugés 5mn à 3000rpm (rotations par minute), le surnageant est aspiré à l'aide d'une pipette. Une seconde centrifugation (5mn, 3000rpm) de celui-ci permet de diminuer les particules pour la purification.

- ***Purification***

Les toxines sont purifiées sur cartouches Sep-pak[®] C18 qui sont fixées sur un système de cuve à vide. Elles sont conditionnées par 7mL de mélange MeOH/H₂O (70/30).

Le surnageant issu de la seconde centrifugation est prélevé avec une seringue de 10mL et filtré sur filtre Millex[®] à 0,45µm. Au préalable, afin de respecter les conditions d'élution 70/30, le surnageant prélevé est dilué dans un volume d'eau défini. L'échantillon homogénéisé à l'aide d'une pipette pasteur par flux-reflux est déposé sur le système filtre-cartouche.

Le système de pompe à vide peut être alors mis en marche. Lors du passage du mélange dans la cartouche, les CTXs sont adsorbées par la phase stationnaire, tandis que les composés plus polaires comme les MTXs sont élués et récupérés dans la première fraction. Les CTXs sont ensuite éluées par passage de 7mL de MeOH/H₂O (90/10).

Chaque fraction est récupérée séchée à l'évaporateur à flux d'air (T^omax : 55°C), ces extraits sont pesés et conservés à 4°C jusqu'à leur dosage. La dernière fraction d'élution contient les CTXs ; leur potentiel de toxicité sera évalué par un test de cytotoxicité sur neuroblastomes de souris.

B. Extraction de masse

a. Principe

L'extraction de masse est une séparation liquide-liquide qui permet de séparer les toxines liposolubles (CTXs) des toxines hydrosolubles (MTXs), par différence d'affinité des toxines pour les solvants de polarité différente. Les deux solvants ayant des propriétés différentes (densité, polarité, ...) ne sont pas miscibles ; ainsi, deux phases bien distinctes sont facilement séparables en ampoules à décanter.

b. Méthode

• Préparation des échantillons

Comme pour l'extraction rapide, les chairs de poisson et de bénéitiers sont prélevées et mixées finement. Chaque échantillon est mis dans des sachets (non fermés) et mis à -20°C en vue de leur lyophilisation. Une fois lyophilisé, la matière sèche obtenue est pesée à 0,1 g près.

• Extraction

Chaque échantillon sous forme de matière sèche est agitée mécaniquement durant 3 à 6hrs dans du MeOH (100%) puis mis aux ultrasons 30mn à 1hrs. Le mélange obtenu est filtré sur Büchner[®], cet extrait méthanolique est séché à l'évaporateur rotatif à 40°C. L'opération est répétée trois fois.

Le composé est dissous à l'aide de dichlorométhane (CH₂Cl₂ : DCM) et d'un mélange MeOH/H₂O (60/40). L'intégralité du résidu méthanolique est agitée dans une ampoule à décanter puis laissée au repos jusqu'à la séparation des phases. Après décantation, trois phases apparaissent : une phase apolaire (DCM), polaire (MeOH/H₂O) et une phase d'émulsion entre les deux précédentes. Cette dernière est plus ou moins importante selon la nature de l'échantillon. La phase apolaire ou

phase liposoluble, est susceptible de posséder des CTXs. La phase polaire ou phase hydrosoluble est susceptible de contenir des toxines de types STXs ou MTXs de plus forte polarité. Quant à l'émulsion, c'est un mélange des deux phases précédentes, de nature non définie et complexe, elle est éliminée. Si cette phase est trop importante et qu'elle est trop longue à décanter, on la centrifuge 5mn à 3000 rpm.

Après plusieurs rinçages du DCM avec le mélange MeOH/H₂O, et inversement, les solvants des deux phases sont évaporés. L'extrait liposoluble obtenu est délipidé. L'extrait hydrosoluble est transféré dans un pilulier avec un minimum d'eau, et congelé, afin d'être lyophilisé. Cet extrait est par la suite testé sur souris afin de voir s'il contient des toxines de types paralysantes, et à quelle concentration.

- **Délipidation**

La matrice des bénitiers étant riche en lipides, il est nécessaire d'effectuer une délipidation de la phase liposoluble afin de la purifier et mieux isoler les CTXs potentiellement présentes, et surtout d'éviter d'avoir une trop grande influence de la matrice organique lors des tests de cytotoxicité sur neuroblastomes.

Le résidu liposoluble contenu dans le ballon est dilué et mis en ampoule avec du cyclohexane (C₆H₁₂) et un mélange MeOH/H₂O aux proportions 80/20. Après agitation de l'ampoule, deux phases apparaissent : (i) la phase apolaire (cyclohexane) contenant essentiellement des lipides et (ii) la phase polaire (MeOH/H₂O) contenant potentiellement les toxines de type CTXs. Les fractions sont évaporées, mise en tube et conservé sec à -20°C. La fraction polaire est testée sur les neuroblastomes. Une phase d'émulsion est parfois observée mais le plus souvent elle est de faible volume voire absente et donc jetée car on ne sait pas ce qu'elle contient.

3. Tests de toxicité

Dans le cadre de cette étude, deux types de tests de toxicité sont utilisés, l'un servant à tester les fractions liposolubles, *test de cytotoxicité sur neuroblastomes* et l'autre les fractions hydrosolubles, *test de toxicité aigüe sur souris*.

A. Test de cytotoxicité

Ce test a été mis en place par Manger en 1993 et adapté à l'évaluation du potentiel toxique des extraits liposolubles grâce aux travaux de thèse de M-Y. Dechraoui-Bottein (1999) et R. Boydrón (2004). Tous les extraits liposolubles susceptibles de contenir des CTXs obtenus par extraction rapide ou extraction de masse sont testés par cette méthode.

a. Principe

Ce test est basé sur la sensibilité des neuroblastomes (cellules du neuroblaste, code N2A) vis-à-vis des neurotoxines ayant pour cible les canaux sodiques, comme les CTXs. Les N2A sont des cellules souches améboïdes et neurales, provenant de souris albinos.

L'objectif est de quantifier le potentiel toxique d'extraits lipidiques biologiques provenant de chairs ou foies de poissons, de bécasses ou de cyanobactéries.

Afin d'augmenter la sensibilité des cellules vis-à-vis des toxines agissant sur les CSSP, deux toxines sont utilisées comme potentialisateurs : l'*ouabaine* (O) et de la *vétridrine* (V). L'O est de la famille des glycosides cardiaques, c'est un inhibiteur spécifique de l'ATPase $\text{Na}^+\text{-K}^+$. Elle empêche la fabrication de cette enzyme qui entraîne le blocage des pompes $\text{Na}^+\text{-K}^+$. Elle est reconnue pour son activité cardiotonique. La V, quant à elle, est un composé alcaloïdique liposoluble se fixant spécifiquement sur le site 2 du canal sodique, il permet sa activation. Elle stimule l'entrée de Na^+ dans la cellule, et en bloquant le canal en position d'ouverture, elle amplifie l'effets des toxines testées. L'action combinée de ces deux composés conduit à une concentration élevée en Na^+ intracellulaire, ce qui a pour conséquence une diminution de la viabilité cellulaire. En présence de ces deux produits, les toxines bloquant les canaux sodiques ont pour effet d'augmenter la survie des cellules de façon dose-dépendante ; alors qu'à l'inverse, les toxines activatrices du CSSP telles que les CTXs, vont agir en augmentant la mortalité cellulaire. Les CTXs mises seules en présence des cellules n'ont que peu d'effet sauf à des concentrations importantes.

Les cellules sont incubées en présence d'O (5mM), de V (0,5mM) et d'extraits à concentrations variables pendant 14hrs. Le dosage des cellules vivantes est effectué par un test colorimétrique utilisant du sel de Thiazol Blue Tétrazolium (MTT).

b. Entretien des cellules

Les cellules N2A sont des cellules adhérentes qui ont un temps de régénération de 12 à 24hrs. Leur milieu de culture contient 88% de RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, contient des acides aminés et vitamines), 10% de sérum de veau fœtal (apport de protéines), 1% de pyruvate de sodium (apport de carbohydrates) et 1% d'antibiotiques et antifongiques, qui vont permettre une large protection contre des bactéries et des champignons.

Afin de maintenir la lignée à une concentration cellulaire optimale pour leur développement et pour les tests de cytotoxicité, plusieurs manipulations d'entretien doivent être faites : renouvellement du milieu de culture, trypsinisation, congélation ou décongélation de cellules. Chacune de ces étapes est développée en annexe n°3.

c. Test de cytotoxicité

Ce test se déroule en trois étapes majeures : (i) l'ensemencement des cellules en microplaques (24hrs), (ii) l'incubation des toxines et de extraits à analyser (14hrs) (iii) et la lecture (2hrs).

* Ensemencement

Nous disposons de microplaques à 96 puits à volume de 200 μL . Les 36 puits extérieurs sont remplis d'eau afin d'éviter les phénomènes d'évaporation, ils constitueront les « blancs ». Les puits intérieurs sont ensemencés à raison de $2,5 \cdot 10^5$ cellules. mL^{-1} (soit 50 000 cellules par puits). Les cellules sont incubées 24hrs à 37°C et 5% de CO_2 .

* Incubation des extraits toxiques

Les puits sont remplis selon un schéma de plaque reproduit en figure 21. Une gamme de concentration de l'extrait liposoluble est préparée par dilution afin de déterminer son IC50 (concentration d'inhibition à 50%). La gamme qui a été choisie durant mon stage est de 4, 8, 16, 31, 63, 125 et 250 μg d'extrait. mL^{-1} .

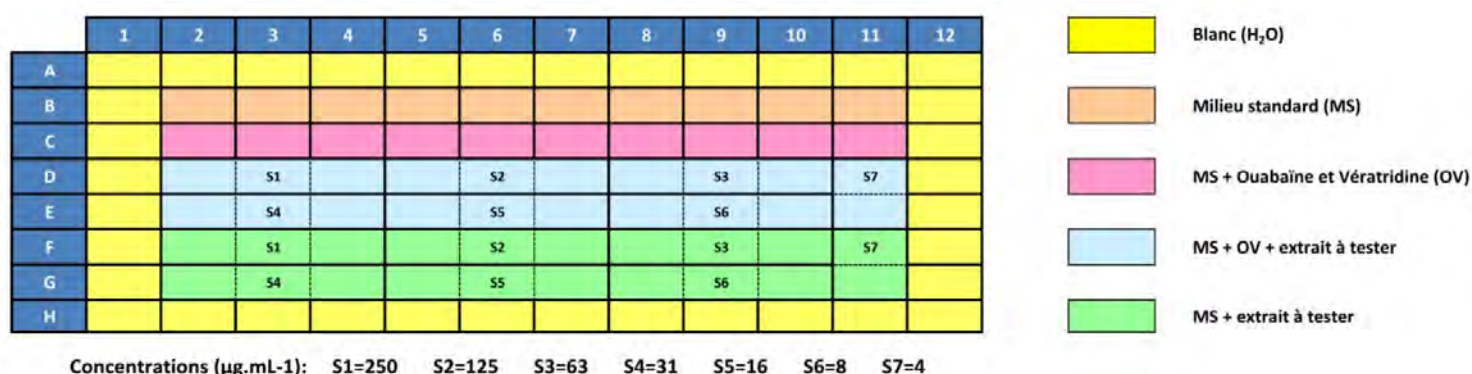


Figure 21 : Schéma d'une plaque de test de cytotoxicité.

Afin de pouvoir valider les données d'une microplaque, un certain nombre de contrôles est nécessaire pour vérifier les paramètres de l'analyse. Dans le schéma de microplaque de la figure 21 :

- La ligne MS (orange) représente un contrôle de la viabilité cellulaire.
- La ligne du dessous OV (rose) permet de vérifier l'effet des potentialisateurs OV seuls vis-à-vis de cellules. Le pourcentage de viabilité cellulaire doit être de 80-90%.
- Enfin, la gamme de concentrations de chaque extrait est testée sans OV (-OV ; bleu) et avec OV (+OV ; vert). Le dosage de la toxicité des extraits avec et sans OV permet d'évaluer la spécificité de la toxicité pour les canaux sodiques. Une forte toxicité des extraits uniquement avec OV démontre une toxicité de type ciguatoxinique.

Pour des raisons, d'économie de consommables, de toxines et surtout d'extraits, un minimum de deux tests par échantillon est effectué. Si les duplicats ne sont pas concordants, il est alors nécessaire de répliquer l'analyse.

** Lecture : test colorimétrique au MTT*

Après 12 à 14hrs d'incubation, les puits sont vidés par retournements vigoureux des microplaques. Un volume de 50µL de MTT à 0.8mg/mL (PBS) est dispensé dans chaque puits. La couleur du milieu passe du jaune au bleu-violacé proportionnellement au nombre de cellules vivantes. Ainsi, un puits jaune clair signifie qu'il n'y a plus de cellules vivantes ou très peu, et une coloration bleu-violacée signifie qu'il y a eut un bon développement cellulaire. Après 1hr d'incubation, chaque puits est complété avec 150µL de DMSO permettant une bonne solubilisation de sel de MTT. Les microplaques sont incubées 1hr afin d'optimiser son action.

Sorties de l'incubateur, les microplaques, sont agitées 5mn et la densité optique (DO) de chaque puits est lue à 490 nm à l'aide d'un lecteur à microplaques Universal Microplate Reader ELx 800TM (BioTek Instruments INC.). Après validation des plaques (détaillée plus bas), le traitement de ces données permet d'obtenir l'IC₅₀ de chaque échantillon à l'aide du logiciel GraphPad Prism® (v. 5.01) (détaillé dans la partie V.).

d. Validation des plaques :

Exemple de l'analyse de l'extrait liposoluble de bénitier référencé L15-B1 effectuée le 13/08/2009)

i. Traitement préliminaire des DO

Après lecture des plaques, les DO lues à 490nm sont reportés sous forme de tableau représenté sous forme de schéma de microplaque (tableau 2 et figure 21).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,121	0,123	0,117	0,120	0,121	0,136	0,126	0,131	0,141	0,147	0,122	0,133
B	0,130	0,450	0,419	0,424	0,436	0,437	0,401	0,401	0,404	0,403	0,409	0,149
C	0,127	0,392	0,383	0,381	0,383	0,390	0,376	0,367	0,394	0,362	0,364	0,148
D	0,132	0,159	0,149	0,147	0,231	0,257	0,244	0,272	0,273	0,250	0,333	0,155
E	0,127	0,303	0,289	0,296	0,311	0,336	0,350	0,341	0,350	0,321	0,312	0,163
F	0,138	0,182	0,176	0,163	0,314	0,308	0,292	0,338	0,334	0,330	0,392	0,158
G	0,131	0,389	0,365	0,392	0,412	0,406	0,396	0,399	0,395	0,396	0,389	0,155
H	0,137	0,147	0,140	0,145	0,144	0,151	0,159	0,163	0,172	0,170	0,163	0,163

Tableau 2 : Résultats bruts en densité optique d'une plaque

ii. Représentation graphique

Tout d'abord, chaque valeur est soustraite par la moyenne des blancs (jaune). Ensuite, les pourcentages de viabilité cellulaire sont calculés :

- pour les résultats des lignes +OV (bleu) : $(DO_X / Moy DO_{OV}) \times 100$
- pour les résultats des lignes -OV (vert) : $(DO_X / Moy DO_{MS}) \times 100$

DO_X = DO d'un extrait X ; $Moy DO_{OV}$ = DO moyenne de la ligne OV (orange) ; $Moy DO_{MS}$ = DO moyenne de la ligne MS.

La moyenne des pourcentages des viabilités cellulaires pour chaque concentration d'extrait est alors calculée, puis reportée dans un graphique. Par exemple, le graphique de la figure 22 représente le pourcentage de viabilité des cellules seules (rose, 100% de viabilité); des cellules en présence d'OV (beige, 85,8%), des cellules avec extraits sans OV (bleu ; -OV) et des cellules avec extraits et OV (rouge ; +OV).

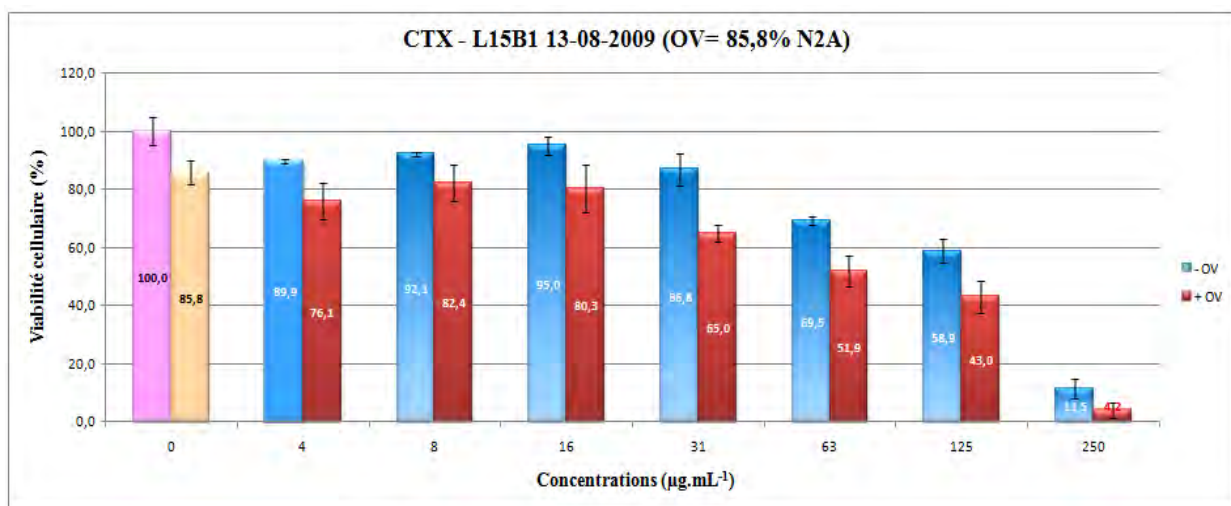


Figure 22 : Graphique des pourcentages de viabilité cellulaire du bénitier B1

iii. Première validation

La moyenne des blancs, la DO et le pourcentage de chaque échantillon pour cellules seules (N2A seules) et cellules + OV (N2A + OV) sont répertoriés dans un tableau (annexe 5). Un extrait de ce tableau (tableau 3) est reporté ci-dessous pour les cinq analyses du Bénitier référencé B1 :

	N2A seules		N2A + OV		Moyenne blancs	Validé
	DO	%	DO	%		
B1 (1)	0,514 ±0,024	100 ±4,62	0,507 ±0,033	98,6 ±6,4	0,146	NON
B1 (2)	0,102 ±0,034	100 ±33,2	0,100 ±0,032	97,3 ±30,8	0,142	NON
B1 (3)	0,164 ±0,020	100 ±12,3	0,144 ±0,012	87,6 ±7,3	0,153	OUI
B1 (4)	0,277 ±0,018	100 ±6,4	0,237 ±0,012	85,8 ±4,2	0,142	OUI
B1 (5)	0,134 ±0,020	100 ±14,6	0,132 ±0,015	98,6 ±11,0	0,195	NON

Tableau 3 : Extrait du tableau de la première validation

iv. Critères de validations finaux

Les conditions de validation sont les suivantes :

- Ecart-type (%) inférieur à 10 %
- N2A + OV (%) inférieur à 90 %
- Résultats cohérents en fonction des gradients de concentration avec des écart-types < 10%

Pour B1(4) par exemple, il y a 6,4% d'écart-type pour N2A seules, 4,2% pour N2A+OV et 85,8% de viabilité cellulaire. De plus, sur son graphique (graphique ci-dessus), il a bien des résultats cohérents en fonction des gradients de concentrations et avec de bons écart-types. Les conditions sont donc bien respectées.

B. Test de toxicité aigüe sur souris

Ce test permet l'analyse d'extraits dont nous ne connaissons pas leur contenu toxique. Les extraits hydrosolubles seront testés afin de voir en fonction de la réaction de la souris, quels types de toxines ils contiennent (paralysantes, diarrhéiques, ...).



Figure 23 : Injection d'une souris par voie intrapéritonéale

(<http://www.ahwla.org.uk/site/tutorials/BVA/BVA06-Rat/BVA06-Images/BigHorizontal-0161.jpg>) [consulté le 22/08/09]

L'extrait est dilué dans une solution aqueuse isotonique contenant $0,9\text{g.L}^{-1}$ de NaCl et $0,1\text{g.L}^{-1}$ de Tween[®] 60 (surfactant non-ionique diminuant la tension superficielle des membranes cellulaires et facilitant ainsi la pénétration des molécules dans la cellule). Le volume d'injection est de $300\mu\text{L}$, et l'injection se fait par voie intrapéritonéale (i.p.) (figure 23) à des souris blanches OF1 (Oncins France souche 1) d'environ 20g., qui sont fournies par l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie. La souris « témoin » reçoit $300\mu\text{L}$ de la solution aqueuse seule. Chaque concentration est testée sur deux souris. La concentration moyenne de départ est de 5mg d'extrait par g. de souris. Si celle-ci représente une concentration trop élevée, elle est diminuée par la suite, ou bien inversement.

Pour chaque souris, le poids, le sexe, la quantité injectée, l'heure d'injection, les symptômes et les modifications comportementales sont enregistrés sur 48h (fiche d'observations en annexe 4). Les souris toujours en vie à la fin de l'expérience sont sacrifiées avec du chloroforme.

IV. Résultats et discussion

1. Tests de cytotoxicité sur neuroblastomes de souris

A. Résultats

Les données de plaque validées sont analysées à l'aide du logiciel GraphPad Prism® afin d'obtenir l'IC₅₀ de chaque échantillon testé. Le coefficient de détermination (R²) est important à connaître car dans les régressions, c'est un critère permettant de mesurer la qualité du modèle envisagé. Plus le R² est proche de 1, plus le modèle s'adapte bien aux données et donc plus sûre est la valeur de l'IC₅₀ donnée (critère d'adéquation).

Les paramètres d'analyse sont :

- **courbe à régression non linéaire** (figure 24)
- **log (inhibitor) vs. Response** avec comme équation $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{-(X - \text{LogIC}_{50})})$
- **contrainte** : les valeurs inférieures à 0 ne sont pas prises en compte (« Bottom must be greater than 0.0 »)

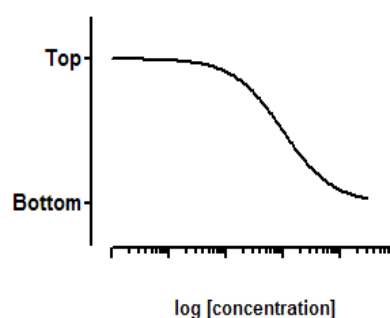


Figure 24 : Représentation du type de courbe que donne la méthode utilisée

La méthode utilisée est détaillée en annexe 7.

Les IC₅₀ obtenus et les R² sont répertoriés dans un tableau (annexe 5). Puis à partir de celui-ci, une dernière validation est effectuée. Le R² ne doit pas être inférieur à 0,8, sans quoi la valeur de l'IC₅₀ n'est pas valide. Un extrait du tableau de synthèse de l'analyse sous Graphpad est donné dans le tableau 4. Par exemple, le résultat surligné en jaune n'est pas validé en raison de la valeur du R² qui est trop faible.

	IC ₅₀		Moyenne IC ₅₀		R ²		Moyenne R ²	
	- OV	+ OV	- OV	+ OV	- OV	+ OV	- OV	+ OV
B1 (3)	147,4	88,88	120,5	86,73	0,635	0,8295	0,8627	0,8497
B1 (4)	120,5	84,57			0,8627	0,8699		

Tableau 4 : Extrait du tableau final des résultats

La viabilité cellulaire (%) en fonction de la concentration de l'extrait (mg/mL) avec et sans OV, est donnée sous forme de graphique (figure 25 et 26). L'ensemble du traitement de ces données est reporté en annexe 5. Il est possible de déterminer le caractère ciguatoxique d'un extrait grâce au profil des courbes obtenues après analyse.

Prenons l'exemple du profil de B11(1) (figure 25), les courbes -OV et +OV sont très similaires. Cela signifie que l'action d'OV n'a pas influé sur la toxicité de l'extrait liposoluble. La toxicité n'est pas spécifique au canal sodique et ne provient donc pas de CTXs ou de toxines agissant sur le CSSP. En revanche, il se peut qu'elle soit due à l'influence de la matrice du bénitier ou à d'autres toxines inconnues n'agissant pas sur les canaux sodiques. Quant au profil de B6(1) (figure 26), il indique la présence éventuelle de CTXs. Il est facile d'apercevoir que les deux courbes n'ont pas le même profil ; la mortalité cellulaire est accrue en présence d'OV qui a favorisé l'action de ces toxines liposolubles sur les canaux sodiques.

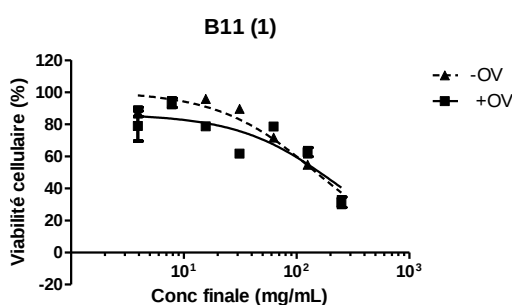


Figure 26 : Résultat graphique de B11 (1)

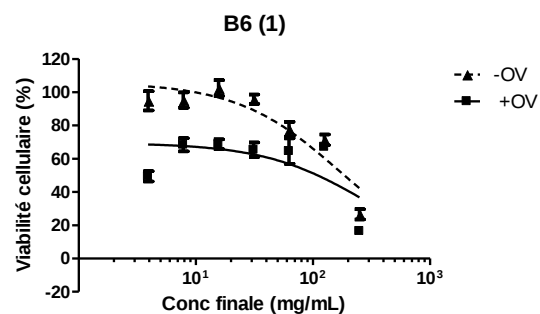


Figure 25 : Résultat graphique de B6 (1)

B. Discussion

L'ensemble des résultats validés lors de mon stage (annexe 5) ne permettent pas de conclure sur les toxicités des bénitiers récoltés. En effet, le nombre de réplicats n'est pas suffisant (concordance de l'IC₅₀ et faible valeur du coefficient R²). Aussi, les profils des courbes variant souvent pour un même échantillon, une cohérence entre les résultats ne permet d'être déceler. Il n'est donc pas possible à ce stade de l'analyse de quantifier la toxicité des différents extraits de bénitier, ni de caractériser la présence ou non de CTXs. Nous ne pouvons donc conclure sur une différence de toxicité entre les extraits prélevés en zone toxique et non toxique.

Les raisons pour lesquelles je n'ai pas eu de résultats complets avec une bonne précision et répétabilité peuvent être multiples. Tout d'abord, travailler sur du vivant reste très imprévisible. En effet, la réponse des cellules peut être variable pour différentes raisons : le vieillissement naturel de celles-ci (passage des cellules, décongélation, congélation...) agit sur leur sensibilité. Les manipulations peuvent également influencer : mauvais rinçage, choc de température, mise en contact avec la Trypsine-EDTA trop longue,

Il n'est pas aisé d'avoir une même viabilité cellulaire pour chaque test et même pour chaque répliquat. Le tableau de validation n°1 (annexe 5) montre bien la grande variation de viabilité cellulaire qu'il peut y avoir. La DO des N2A seules varie de 0,102 à 0,531.

Il est important de contrôler la viabilité cellulaire qui traduit l'état de nos cellules. Une mauvaise viabilité cellulaire va faciliter l'action des toxines présentes (développement cellulaire de moins bonne qualité et diminution de leur résistance) et induirait ainsi une surévaluation du potentiel toxique des extraits.

Ainsi, afin d'améliorer les résultats, il aurait premièrement fallu reproduire les tests de cytotoxicité (manque de temps) et définir pour la viabilité cellulaire (N2A seules) une valeur de DO à atteindre pour valider une plaque. La répétabilité serait alors améliorée et les résultats bien exploitables.

2. Tests sur souris

Pour des raisons d'approvisionnement en souris, l'ensemble des extraits n'a pu être testé. Trois extraits ont été testés : L15 B1, B2 et B7. Les résultats sont reportés en annexe 4.

Les observations indiquent une légère différence de toxicité entre B1-B2 et B7. En effet B7 qui provient de la zone réputée non toxique de Lifou, n'a pas provoqué de mort de souris à 5mg d'extrait.g⁻¹ de souris, contrairement à B1 et B2 où 1 des 2 souris est morte. Néanmoins les temps de récupération pour les 3 échantillons restent similaires. Donc B7 semble être toxique, mais légèrement moins que les deux autres bénitiers.

Les symptômes observés sont les mêmes pour les trois extraits. Une paralysie générale est observée et la mort survient par détresse respiratoire. Il est donc fort probable que les bénitiers contiennent des toxines types paralysantes.

3. Surveillance en baie de Prony

A la suite des deux missions de prélèvements effectuées durant mon stage, aucun dinoflagellé du genre *Gambierdiscus* n'a été observé. Cela signifie donc que la baie de Prony n'est pas encore une zone ciguatérigène. Il faut tout de même voir si l'absence de ces microalgues n'est pas corrélée avec la saison fraîche, car c'est une période non favorable à un bon développement microalgale.

Conclusion

Les résultats obtenus lors de mon stage n'ont pas permis de confirmer la différence de toxicité ciguatérique des deux zones à Lifou. Pour cela, il aurait fallu plus de temps afin de pouvoir répéter les tests de cytotoxicité sur neuroblastomes de souris pour chaque bénitier. Avec plus de temps également, il aurait été possible de connaître les toxicités des extraits hydrosolubles par les tests *in vivo* sur les souris. Une différence de toxicité en la zone réputée toxique et non toxique pourrait être mise en évidence.

Durant mon stage, j'ai également pu traiter les chairs de poissons prélevées lors de la mission Lifou 15. Ils seront testés ultérieurement au laboratoire. La matrice de la chair étant moins complexe que pour celle des bénitiers, les tests pourraient permettre de déceler si d'une part il y a des CTXs et d'autre part s'il y a bien une différence de ciguatoxicité entre les deux zones.

Malgré la nécessité de compléter ces résultats, ils montrent bien la présence d'une toxicité dans les fractions hydrosolubles et liposolubles de la plupart des bénitiers. L'absence de dinoflagellés du genre *Gambierdiscus* et l'abondance de cyanobactéries benthiques sur la zone suggère fortement que les cas de gratte sont bien dû à ces microorganismes. Néanmoins, il reste à mettre en évidence quelles sont les cyanotoxines qui provoquent ce type d'intoxication ciguatérique et quelle est la structure des « CTX-like » impliquées. Des analyses de chromatographie (HPLC-MS ou GC-MS) et d'analyse structurale (RMN) sont actuellement en cours sur les extraits des missions des années précédentes. Et les extraits préparés lors du stage seront également analysés pour en déterminer leurs compositions toxiques.

Lors de ce stage, j'ai découvert le raisonnement et les étapes d'un suivi écotoxicologique temporel d'un écosystème marin, en passant par le choix des zones et des points de prélèvement, les prélèvements, les extractions des toxines ainsi que différents tests toxicologiques. Aussi en terme de technique, j'ai appris à utiliser des appareils en chimie d'extraction (évaporateurs rotatifs, évaporateur à flux d'air...) et également les pratiques de biologie cellulaire (manipulation et entretien des organismes vivants (cellules N2A et souris). Je me suis rendu compte de la difficulté à travailler avec du vivant et d'obtenir une bonne reproductibilité dans les résultats.

Références Bibliographiques

- Adachi R. and Fukuyo Y. 1979. The thecal structure of a marine toxic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* gen. et sp. nov. collected in a ciguatera endemic area. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 45:67-71.
- Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (AFSSET), Évaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries et de leurs toxines dans les eaux destinées à l'alimentation, à la baignade l'eau de baignade et aux autres activités récréatives, juillet 2006.
- Boydron-Le Garrec, R., Benoit, E., Sauviat, M.-P., Lewis, R.J., Molgo', J., Laurent, D., 2005. Ability of some plant extracts, traditionally used to treat ciguatera fish poisoning, to prevent the in vitro neurotoxicity produced by sodium channel activators. Toxicon 46 (6), 625–634.
- Caire, J.F., Raymond, A. and Bagnis, R. 1985. Ciguatera: Study of the setting up and the evolution of *Gambierdiscus toxicus* population on an artificial substrate introduced in an atoll lagoon with follow up of associated environmental factors. Proc. 5th Int. Coral Reef Symp., 4, 429.
- Capra M. et Cameron J. 1985. Les effets de la ciguatoxine sur les nerfs des mammifères. Proceedings of the 5th International Coral Reef Congress, Tahiti, 4:457-461.
- Chateau-Degat M.L., « Les toxines marines : problèmes de santé en émergence », *Vertigo* - la revue électronique en sciences de l'environnement, Volume 4 Numéro 1 | mai 2003, [En ligne], mis en ligne le 01 mai 2003. URL : <http://vertigo.revues.org/index4698.html>. Consulté le 24 août 2009.
- Chinain M., Germain M., Deparis X., Pauillac S. and Legrand A.M. 1999. Seasonal abundance and toxicity of the dinoflagellate *Gambierdiscus* spp. (Dino-phyceae), the causative agent of ciguatera in Tahiti, French Polynesia. Marine Biology, 135:259-267.
- Dechraoui, M.Y., Naar, J., Pauillac, S., Legrand, A.-M., 1999. Ciguatoxins and brevetoxins, neurotoxic polyether compounds active on sodium channels. Toxicon 37 (1), 125–143.
- Delépine R., Boudouresque C.-F., Fradà Orestano C., Noailles M.-C. et Asensi A., 2002. Algues et autres végétaux marins. Fiches de la FAO.
- Gillespie N.C., Lewis R.J., Pearn J.H., Bourke A.T.C., Holmes M.J., Bourke J.B. and Shields W.J. 1986. Ciguatera in Australia. Occurrence, clinical features, pathophysiology and management. The Medical Journal of Australia 145:584-590.
- Ifremer, 2006. Guide d'information des phycotoxines paralysantes (PSP). Centre de Nantes.
- Laurent D., Bourdy G., Amade P., Cabalion P. et Bourret D. 1993. La gratte (ou ciguatera) ; ses remèdes traditionnels dans le Pacifique Sud. Collection Didactiques, Paris: ORSTOM Éditions.
- Laurent D., Kerbrat A.S., Darius H.T., Girard E., Golubic S., Benoit E., Sauviat M.P., Chinain M., Molgo J., Pauillac S. 2008. Are cyanobacteria involved in Ciguatera Fish Poisoning-like outbreaks in New Caledonia? Harmful Algae 7, 827-838.
- Laurent D., Yeeting B., Labrosse P., Gaudechoux J.P. 2005. Ciguatera un guide pratique (field reference guide). Secretariat of the Pacific Community, Agdex Pacific Islands 493/096. CPS & IRD collaboration.
- Legrand A.M., Cruchet P., Bagnis R., Murata M., Ishi-bashi Y. and Yasumoto T. 1990. Chromatographic and spectral evidence for the presence of multiple ciguatera toxins. In: Toxic marine phytoplankton (Graneli E., Sundström B., Edler L., Anderson D.M., eds.) New York: 374-378.
- Legrand A.M., Fukui M., Cruchet P., Ishibashi Y. and Yasumoto T. 1991. Characterization of ciguatox-ins from different fish species and wild *G. toxicus*. Proceedings of the 3rd International Conference on Ciguatera, Puerto Rico.
- Legrand A.M., Fukui M., Cruchet P. and Yasumoto T. 1992. Progress on chemical knowledge of ciguatoxins. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique 85(5 Pt 2):467-469.
- Lewis R.J. 1988. Negative inotropic and arrhythmic effects of high doses of ciguatoxin on guinea pig atria and papillary muscles. Toxicon 26:639-649.

- Lewis R.J. 2000. Ciguatera management. SPC Live Reef Fish Trade Bulletin 7:II-13.
- Lewis R.J., Molgo J. and Adams D.J. 2000. Ciguatoxins: Pharmacology of toxins involved in ciguatera and related marine poisonings. In: Seafood and Freshwater Toxins (Botana, L. ed.), Seafood. Marcel Dekker, New York. 419-447.
- Lewis R.J., Sellin M., Poli M.A., Norton R.S., MacLeod J.K. and Sheil M.M. 1991. Purification and characterization of ciguatoxins from moray eel (*Lycodontis javanicus*, Muraenidae). Toxicon 29(9):III5-II27.
- Lewis R.J., Vernoux J.P. and Brereton J.P. 1998. Structure of Caribbean ciguatoxin isolated from *Caranx latus*. Journal of the American Chemical Society, 120:5914-5920.
- Manger R.L., Leja L.S., Lee S.Y., Hungerford J.M., Hokama Y., Dickey R.W., Granade H.R., Lewis R.J., Yasumoto T. and Wekell M. 1995. Detection of sodium channel toxins: directed cytotoxicity assays of purified ciguatoxins, brevetoxins, saxi-toxins, and seafood extracts. Journal of AOAC International 78(2):521-527.
- Murata M., Legrand A.M., Ishibashi Y. and Yasumoto T. 1989. Structures of ciguatoxin and its congeners. Journal of the American Chemical Society III:8929-8931.
- Murata M., Naoki H., Iwashita T., Matsunaga S., Sasaki M., Yokohama A. and Yasumoto T. 1993. Structure of maitotoxin. Journal of American Chemical Society, 115:2060-2062.
- Ohizumi Y. 1987. Pharmacological actions of the marine toxins, ciguatoxin and maitotoxin, isolated from poisonous fish. Biological Bulletin 172:132-136.
- Situation sanitaire en Nouvelle-Calédonie, 2003- La ciguatera I.3.6 - p_1
- Tachibana K. 1980. Structural studies on marine toxins. PhD dissertation, University of Hawai'i.
- Yasumoto T., and Murata M. 1990. Polyether toxins involved in seafood poisoning. In: Hall S., Strichartz G. (eds). Marine toxins: Origin, structure and molecular pharmacology. American Chemical Society, Washington D.C. :120-132.
- Yasumoto T., Nakajima I., Bagnis R.A. and Adachi R. 1977. Finding of a dinoflagellate as a likely culprit of ciguatera. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 43:1021-1026.
- Yasumoto T., Seino Y., Murakami Y. and Murata M. 1987. Toxins produced by benthic dinoflagellates. Biological Bulletin 172:128-131.
- Yokohama A., Murata M., Oshima T., Iwashita T. and Yasumoto T. 1988. Some chemical properties of maitotoxin, a putative calcium channel agonist isolated from a marine dinoflagellate. Journal of Biochemistry 104(2):184-187.

ANNEXES

Annexe 1 : *Précautions et préventions pour la ciguatéra (p.41).*

Annexe 2 : *Protocole de surveillance et de prélèvement d'une zone ciguatérigène (p.42).*

Annexe 3 : *Entretien des cellules (p. 46).*

Annexe 4 : *Test de toxicité sur souris (p.48).*

Annexe 5 : *Résultats des tests de cytotoxicité sur neuroblastomes de souris (p.50).*

Annexe 6 : *Résultats des extractions (p.54).*

Annexe 7 : *Equation: $\log(\text{inhibitor})$ vs. response (p.55).*

Annexe 8 : *Protocoles d'extraction sous forme de fiches pratiques (p.56).*

Annexe 9 : *Matériel utilisé (p.58).*

ANNEXE 1

Précautions et préventions pour la ciguatéra

Afin de minimiser les risques d'intoxication, il convient d'observer les quelques précautions suivantes :

- Évitez de manger les espèces de poissons localement réputées être toxiques (requins, murènes, anglais, dorades, carangues, barbillons, loches...). Renseignez-vous auprès des pêcheurs coutumiers du lieu de pêche.
- Soyez prudent, évitez les poissons de récif de grande taille (supérieurs à 10 kg). Dans la mesure du possible, sélectionnez les petits dans l'espèce, la toxicité étant souvent proportionnelle à la taille.
- Videz soigneusement les poissons. Ne mangez pas la tête, les œufs, les viscères, le foie en particulier qui sont plus toxiques que les filets.
- Ne croyez pas que la congélation, la cuisson, le fumage ou qu'un autre mode de préparation ou d'assaisonnement puissent éliminer la toxine.
- Ne vous fiez pas aux mouches, fourmis ou pièces d'argent pour déceler un poisson toxique, ces techniques ont trompé beaucoup de monde. Le chat, malheureusement pour lui, est plus sensible que l'homme.
- Après une première intoxication, évitez au moins pendant un mois de consommer du poisson ou autres fruits de mer, quels qu'ils soient. Abstenez-vous d'absorber des boissons alcoolisées.
- Attention aux régions réputées indemnes de ciguatéra ; elles peuvent être l'objet d'une flambée de microalgues et devenir potentiellement dangereuses (l'inverse est vrai aussi). Méfiez-vous là aussi des poissons âgés.
- Il n'y a pas vraiment de saison pour la ciguatéra. À tout moment, vous pouvez pêcher et consommer un poisson contenant un taux de toxine suffisant pour vous empoisonner.

ANNEXE 2

Protocole de surveillance et de prélèvement d'une zone ciguatérigène

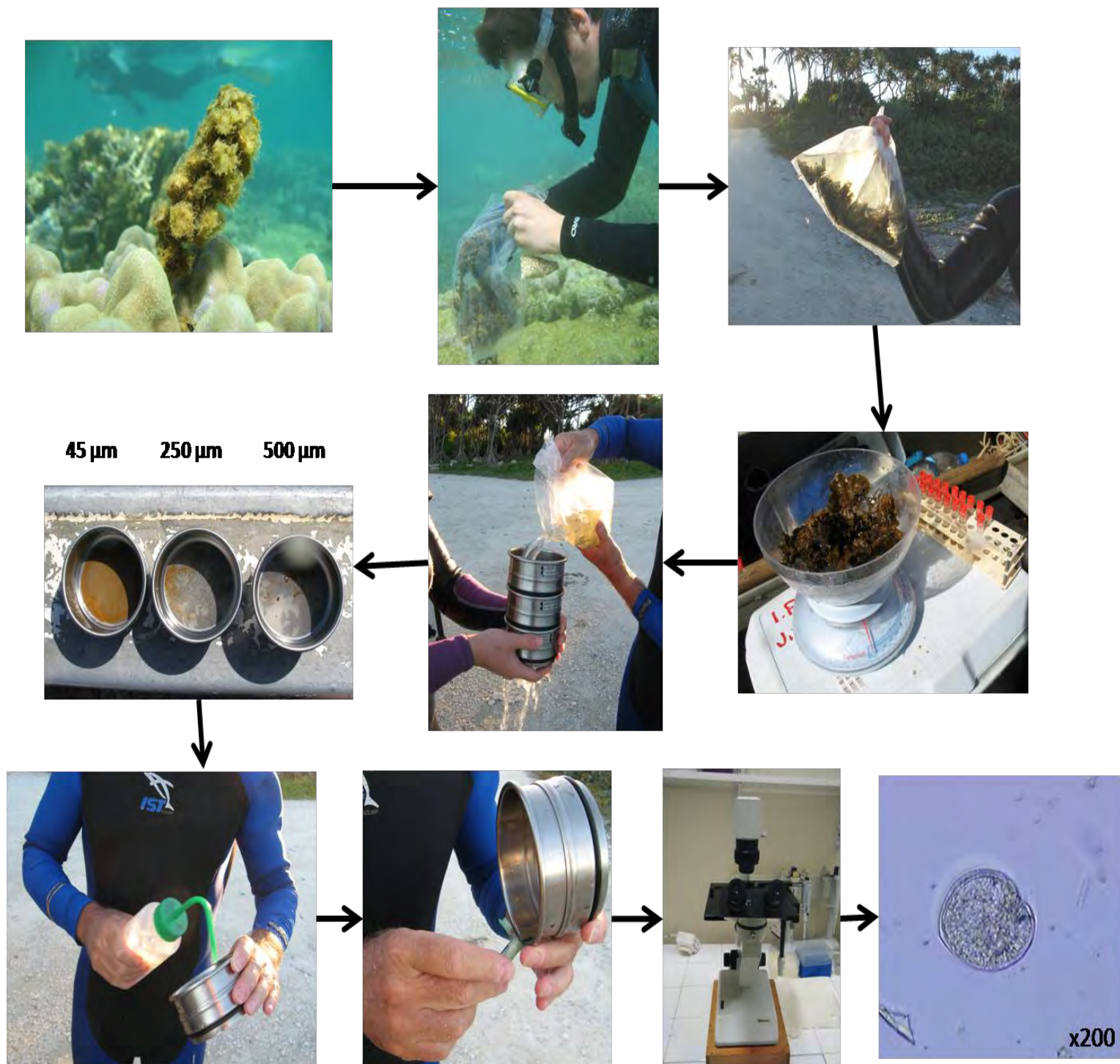


Figure représentant les différentes étapes des manipulations de terrain pour la surveillance d'une zone ciguatérigène.

1- Prélèvement d'échantillons d'algues

a. Équipement requis:

- Équipement de plongée libre (pour la collecte à faible profondeur, <5m)
- Sacs en plastique pour recueillir les échantillons (des sacs à sandwich à fermeture hermétique peuvent être utilisés)
- Marqueur indélébile pour identifier les sacs en plastique (échantillons)
- GPS (Système mondial de localisation) pour identifier les sites

b. Choix des algues hôtes:

Les études antérieures ont justifiés le choix des certaines macroalgues : les algues calcaires rouges *Jania* sp. et *Amphiroa* sp., les algues brunes *Turbinaria ornata* et les algues calcaires *Halimeda* sp., pour les raisons suivantes :

- Elles sont plus susceptibles d'abriter davantage de *Gambierdiscus* spp. que les autres algues.
- Elles sont très courantes dans la plupart des aires récifales du Pacifique.
- Elles ne sont pas à de trop grandes profondeurs.

c. Prélèvement et conservation des échantillons:

Pour chaque échantillon, un minimum de 200g d'algue hôte est ramassé et placée dans un sac en plastique correctement identifié. Le sac contenant l'algue et un peu d'eau de mer est fermé sous l'eau à l'aide d'un élastique et ramené à terre ou sur le bateau pour le traitement.

2- Extraction de cellules de *Gambierdiscus* spp. des algues hôtes

a. Équipement requis:

- Balance
- Bocal ou bouteille en plastique à grande ouverture, avec couvercle/bouchon
- Tamis de différents calibres - 500 μm , 250 μm et 45 μm
- Flacon laveur en plastique
- Eau de mer
- Flacons de 50 mL à bouchon
- Formol ou alcool éthylique

b. Procédure:

La méthode de séparation des dinoflagellés des macroalgues hôtes, telle qu'employée par Yasuno-to *et al.* (1979) et modifiée par Chinain et al, 1999 consiste dans un simple « lavage ».

- 1) Agitation vigoureuse du sac contenant les algues et de l'eau de mer afin de décoller les microalgues épiphytes
- 2) L'eau de mer du sac est filtrée, d'abord avec le tamis à calibre de 500 μm , puis avec celui de 250 μm , et enfin avec celui de 45 μm .
- 3) Le résidu du tamis de 45 μm est versé dans un flacon de 50 mL, correctement identifié, et on ajoute 5 mL de formol pour la conservation.
- 4) L'opération est répétée pour chaque échantillon.
- 5) Le résidu qui se trouve dans les flacons est alors prêt pour le comptage.

Placez les flacons d'échantillons, bien fermés, dans une boîte, en vue d'un comptage ultérieur.

3- Comptage du nombre de cellules de *Gambierdiscus* spp. et estimation des densités

a. Équipement requis:

- Microscope binoculaire
- Lame de comptage de cellule
- Compteur
- Micropipette de 100µL
- Pied à coulisse (précision 0,1 mm)

b. Procédure:

- 1) Les échantillons de résidus sont laissés à reposer dans les flacons pendant au moins quelques jours. Le dépôt comporte une couche sédimentaire basale, une couche médiane de matière principalement organique, dont une partie est en suspension, et une couche supérieure formée d'une solution transparente de formol et d'eau de mer.
- 2) À l'aide de la micropipette, un volume de 100µL de la couche organique est prélevé, et est placé sur une lame en verre pour le comptage au microscope.
- 3) La présence de *Gambierdiscus* spp. est alors détectée par observation au microscope. Le nombre de cellule est compté.
- 4) Il est conseillé pour chaque échantillon, de compter au moins trois sous-échantillons de 100µL pour la numération au microscope.

ANNEXE 3

Entretien des cellules

- **Trypsinisation**

- * *Principe*

Cette étape intervient avant plusieurs traitements : (i) l'amplification ou l'entretien d'une concentration cellulaire, (ii) l'ensemencement en microplaques pour les tests de cytotoxicité ou (iii) la congélation pour la conservation des cellules.

Les cellules forment un tapis cellulaire sur le fond du flacon de culture, l'action combinée de la trypsine et de l'EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique) permet de détacher le tapis et d'isoler les cellules les unes des autres. La trypsine est une enzyme de la famille des protéases, qui hydrolyse les liaisons peptidiques des protéines permettant l'adhérence des cellules, et elle permet donc le décollement des cellules du flacon de culture. L'EDTA quant à lui, réduit la concentration extracellulaire en ions calcium (Ca^{2+}), ce qui inactive potentiellement les cadhérines et glycoprotéines, situées à la surface de chaque cellule, et qui permettent les liaisons intercellulaires. Ainsi, il permet une isolation de chaque cellule.

- * *Méthode*

Tout d'abord, le tapis cellulaire est nettoyé des cellules mortes et des cations libres (Ca^{2+} et Mg^{2+}) par ajout de 5 à 10mL de Tampon Salin Phosphaté (PBS). Cela est nécessaire car le mélange trypsine-EDTA n'est pas actif en présence de ces ions divalents qui maintiennent les pontages cellules-cellules et cellules-support.

Après avoir enlevé le PBS, du mélange trypsine-EDTA est ajouté puis incubé environ 10 minutes à 37°C, température à laquelle le mélange est le plus efficace. A cet instant, il est impératif de diluer le mélange avec du milieu de culture, car au-delà de 10 minutes, celui-ci peut dégrader les cellules. A l'aide d'une pipette, par flux-reflux contre les parois du flacon, les cellules se séparent mieux entre elles. Il en résulte une mise en suspension de cellules rondes, individualisées.

Le comptage cellulaire est effectué sur une lame Kova-Slide® 10 (figure ci-dessous), à l'aide de bleu de Trypan. Exactement 10µL de bleu de Trypan sont mixés à 10µL de suspension cellulaire aliquotée durant 5mn. Une lame contient 10 cellules individuelles à grille quadrillée. Chaque cellule comporte 1 grille formée de 9 cases, chacune d'entre elles est subdivisée en 9 petits carrés. La concentration est calculée à l'aide de cette formule : $C = n \times d \times 1000 \times 10$ (n=nombre moyen de cellules comptées sur 4 cases ; d=facteur de dilution, ici 2).

Ce colorant s'introduit seulement dans le cytoplasme des cellules mortes et permet de quantifier le pourcentage de cellules mortes et ainsi d'évaluer l'état et la qualité de notre lignée cellulaire. La concentration cellulaire et le pourcentage de mortalité des cellules quantifiés permettent d'évaluer la dilution correspondant à nos besoins (repiquage, ensemencement en microplaque ou cryoconservation).



Lame de comptage Kova-Slide® 10.

- **Congélation/Décongélation**

Les cellules sont congelées régulièrement. L'entretien d'un stock cellulaire est impératif pour différentes raisons comme les contaminations, l'erreur de manipulation, le vieillissement de la lignée (perte de sensibilité).

- * *Congélation*

Arrivée à confluence, après trypsination et comptage, si le taux de viabilité est supérieur à 90%, les cellules peuvent être congelées. La suspension cellulaire est centrifugée 5mn à 3000rpm et repris dans un volume précis de milieu de congélation. Celui-ci est composé de sérum de veau fœtal (SVF) (50%), de RPMI (40%) et de DMSO (10%).

Le DMSO est un **cryoconservateur** : il permet d'éviter l'éclatement des cellules lors de la congélation. A température ambiante, il dégrade les membranes cellulaires. Donc une fois les cryotubes remplis de cellules, ils sont placés à -18°C, puis 24h après à -80°C pour une conservation lente (1-2 ans). Pour une conservation supérieure à 2 ans, les cellules sont conservées dans de l'azote liquide à -196°C. En général, 3 millions de cellules sont conservés par cryotube de 1,5 mL.

- * *Décongélation*

Les cellules doivent être décongelées rapidement par ajout de 10mL de milieu de culture complet à 37°C. Il est important d'effectuer cette étape rapidement afin de diluer le DMSO (dégradation des membranes). Les cellules sont ensuite incubées à 37°C et 5% de CO₂. Après 2H, le milieu de culture est changé pour ne garder que les cellules viables. En effet, au bout de ce temps-là, seules les cellules qui sont dans un bon état seront fixées au fond du flacon de culture.

ANNEXE 4

Test de toxicité sur souris

Fiche d'observation de souris pour le test :

Test souris ip

Bénitiers Lifou 16 fractions Hydro (1) – 24/08/2009

Paramètres d'injection			
Nature :	Volume (µL) :	Conc (mg/g) :	C a g e :

Observations			
Souris N°:	Pds (g) :	Sexe :	heure d'injection :
Souris N°:	Pds (g) :	Sexe :	heure d'injection :

Résultats obtenus durant le stage :

	date d'injection	cage	sexe	extraits	conc extrait (mg/g de souris)	masse souris (g)	quantité d'extrait injecté (mg) 300µL injecté	mort	temps de récup'	principaux symptômes
L15 Benitier	19/08/2009	1	M	L15 B1 (H ₂ O)	2,5	20	50	-	2h30	progression paralysie par membres sup, puis générale, CT, début récup' vers 20'
	19/08/2009		F		2,5	24	60	-	2h30	progression paralysie par membres sup, puis générale, CT, début récup' vers 20'
	19/08/2009	2	F		4,0	22	108	-		PB d'injection => probablement dans intestin car évacuation direct par voir anale
	19/08/2009		M		4,0	23	116	-		PB d'injection => probablement dans intestin car évacuation direct par voir anale
	19/08/2009	3	F		5,0	20	50	-	4h00	RC, détresse respiratoires, paralysie, yeux exorbités, spasmes, coma, début de légère récupération vers 30', à 2h d'ict diff
	19/08/2009		F		5,0	20	50	4'	-	paralysie générale à 3', mort par détresse ventilatoire
	19/08/2009	4	F	L15 B2 (H ₂ O)	2,5	20	50	-	2h15	lente dimi racativité, RC contraction abdominale, recroquevillé, pas de paralysie
	19/08/2009				2,5	28	70	-	2h15	lente dimi racativité, RC contraction abdominale, recroquevillé, pas de paralysie
	19/08/2009	5	F		4,0	21	83	-	2h30	paralysie générale, comateuse, début de récup à 20', ms déplot diff et tiube
	19/08/2009		M		4,0	24	95	-	2h30	paralysie générale, comateuse, début de récup à 20', ms déplot diff et tiube
	19/08/2009	6	M		5,0	24	120		2h00	paralysie postérieure puis générale à 2', RC, spasmes, coma, début de récup' vers 20'
	19/08/2009		F		5,0	28	140	14'	-	paralysie générale à 3', coma, mort par détresse ventilatoire
	19/08/2009	7	F	L15 B7 (H ₂ O)	2,5	22	55	-	3h00	contraction abdominale, RC, dimi réactivité, pas de paralysie
	19/08/2009		F		2,5	26	65	-	2h10	contraction abdominale, RC, dimi réactivité, pas de paralysie
	19/08/2009	8	F		4,0	22	90	-	3h00	paralysie générale, RC, début de récup à 10'
	19/08/2009		M		4,0	22	93	-	3h00	paralysie générale, RC, début de récup à 13'
	19/08/2009	9	F		5,0	20	100	-	4h00	paralysie générale, RC, début récup' à 18'
	19/08/2009		M		5,0	22	110	-	4h00	paralysie générale, RC, début récup' à 15'
		T	M	Témoin	0,0	2	0	-	-	RAS

ANNEXE 5

Résultats des tests de cytotoxicité sur neuroblastomes de souris

Tableau de la première validation

	N2A seules		N2A + OV		Moyenne blancs	Validé
	DO	%	DO	%		
B1 (1)	0,514 ± 0,024	100 ± 4,62	0,507 ± 0,033	98,6 ± 6,4	0,146	NON
B1 (2)	0,102 ± 0,034	100 ± 33,2	0,100 ± 0,032	97,3 ± 30,8	0,142	NON
B1 (3)	0,164 ± 0,020	100 ± 12,3	0,144 ± 0,012	87,6 ± 7,3	0,153	OUI
B1 (4)	0,277 ± 0,018	100 ± 6,4	0,237 ± 0,012	85,8 ± 4,2	0,142	OUI
B1 (5)	0,134 ± 0,020	100 ± 14,6	0,132 ± 0,015	98,6 ± 11,0	0,195	NON
B2 (1)	0,305 ± 0,015	100 ± 5,0	0,261 ± 0,022	85,4 ± 7,3	0,144	OUI
B2 (2)	0,348 ± 0,019	100 ± 5,5	0,288 ± 0,020	82,7 ± 5,8	0,148	OUI
B3 (1)	0,531 ± 0,016	100 ± 3,0	0,468 ± 0,022	88,1 ± 4,1	0,147	OUI
B3 (2)	0,473 ± 0,037	100 ± 9,0	0,459 ± 0,025	97,1 ± 6,5	0,151	NON
B3 (3)	0,124 ± 0,010	100 ± 7,9	0,101 ± 0,009	81,7 ± 6,9	0,138	OUI
B3 (4)	0,376 ± 0,022	100 ± 7,1	0,351 ± 0,020	93,3 ± 6,1	0,144	OUI
B4 (1)	0,269 ± 0,032	100 ± 11,9	0,278 ± 0,029	103,4 ± 10,6	0,153	NON
B4 (2)	0,110 ± 0,018	100 ± 16,4	0,118 ± 0,020	106,8 ± 18,0	0,136	NON
B4 (3)	0,439 ± 0,033	100 ± 7,4	0,410 ± 0,016	93,2 ± 3,7	0,151	OUI
B5 (1)	0,291 ± 0,040	100 ± 9,0	0,235 ± 0,032	78,1 ± 9,0	0,191	OUI
B5 (2)	0,392 ± 0,038	100 ± 9,6	0,363 ± 0,033	92,5 ± 8,3	0,150	OUI
B6 (1)	0,251 ± 0,029	100 ± 11,37	0,208 ± 0,032	82,9 ± 12,92	0,178	OUI
B6 (2)	0,373 ± 0,045	100 ± 13,35	0,349 ± 0,032	93,5 ± 11,0	0,156	OUI
B7 (1)	0,457 ± 0,065	100 ± 14,2	0,433 ± 0,038	94,7 ± 8,2	0,138	NON
B7 (2)	0,482 ± 0,021	100 ± 4,3	0,420 ± 0,035	87,2 ± 7,3	0,207	OUI
B7 (3)	0,121 ± 0,010	100 ± 8,6	0,104 ± 0,009	85,3 ± 7,7	0,147	OUI
B7 (4)	0,377 ± 0,017	100 ± 6,6	0,326 ± 0,015	86,5 ± 4,0	0,144	OUI
B8 (1)	0,115 ± 0,010	100 ± 9,0	0,104 ± 0,014	90,0 ± 12,1	0,138	OUI
B8 (2)	0,390 ± 0,030	100 ± 7,8	0,353 ± 0,026	90,5 ± 6,7	0,155	OUI
B9 (1)	0,142 ± 0,012	100 ± 8,7	0,115 ± 0,011	81,1 ± 8,0	0,142	OUI
B9 (2)	0,413 ± 0,018	100 ± 4,3	0,370 ± 0,027	89,4 ± 6,5	0,153	OUI
B10 (1)	0,286 ± 0,016	100 ± 5,7	0,245 ± 0,017	85,7 ± 6,0	0,146	OUI
B10 (2)	0,380 ± 0,021	100 ± 5,5	0,307 ± 0,012	80,8 ± 3,3	0,147	OUI
B11 (1)	0,273 ± 0,024	100 ± 8,6	0,223 ± 0,016	81,5 ± 6,0	0,164	OUI
B11 (2)	0,442 ± 0,023	100 ± 5,1	0,348 ± 0,017	78,8 ± 3,8	0,150	OUI
B12 (1)	0,298 ± 0,014	100 ± 4,8	0,244 ± 0,009	81,9 ± 3,1	0,149	OUI
B12 (2)	0,380 ± 0,028	100 ± 7,4	0,323 ± 0,034	85,0 ± 9,0	0,143	OUI

Tableau avec les résultats finaux après traitement avec le logiciel GraphPad Prism®

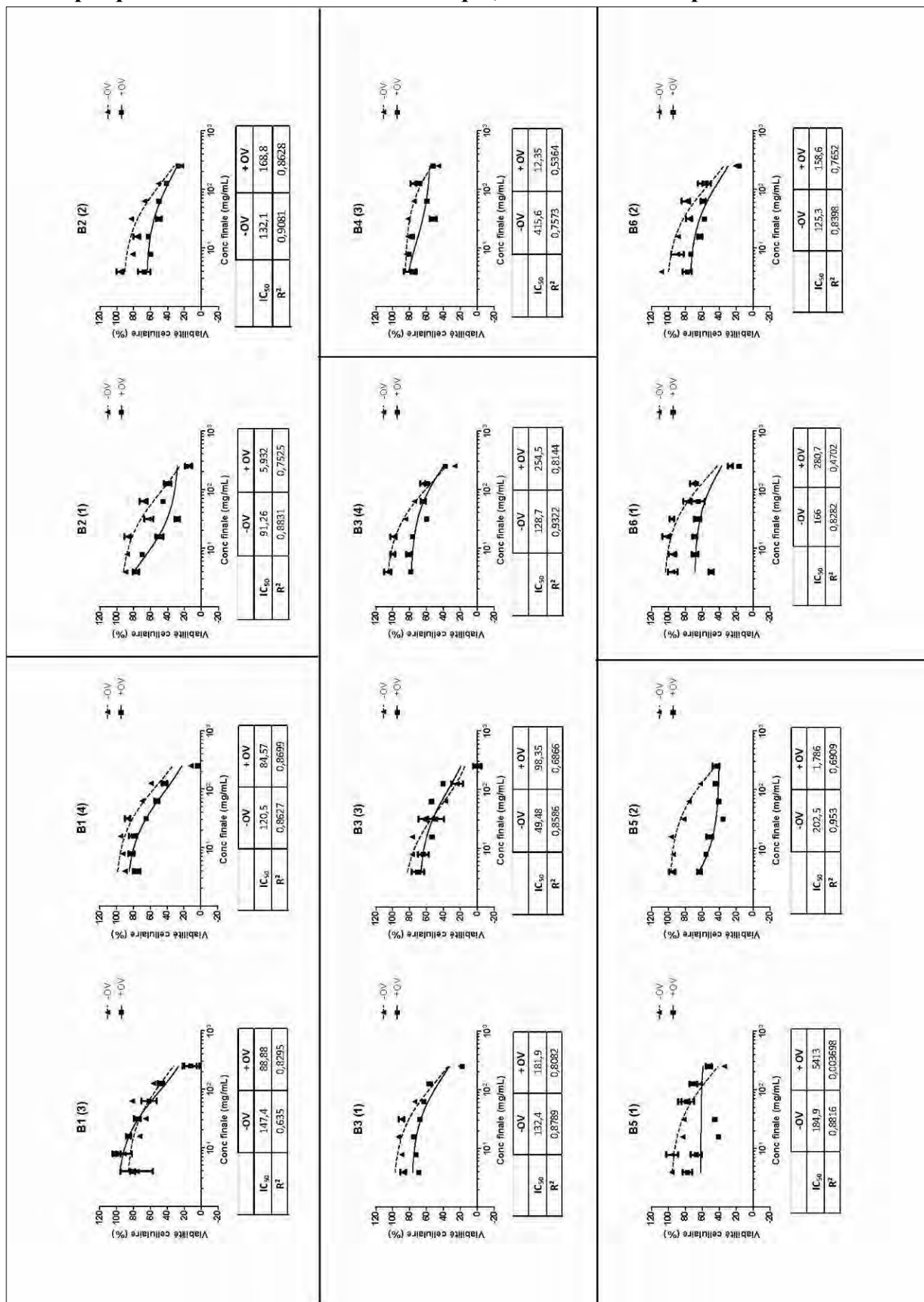
	IC ₅₀		Moyenne IC ₅₀		R ²		Moyenne R ²	
	- OV	+ OV	- OV	+ OV	- OV	+ OV	- OV	+ OV
B1 (3)	147,4	88,88	133,95	86,73	0,635	0,8295	0,7489	0,8497
B1 (4)	120,5	84,57			0,8627	0,8699		
B2 (1)	91,26	5,932	111,68	87,37	0,8831	0,7525	0,8956	0,8077
B2 (2)	132,1	168,8			0,9081	0,8628		
B3 (1)	132,4	181,9			0,8789	0,8082		
B3 (3)	49,48	98,35	103,53	178,25	0,8586	0,6866	0,8899	0,7697
B3 (4)	128,7	254,5			0,9322	0,8144		
B4 (3)	415,6	12,35	415,60	12,35	0,7573	0,5364	0,7573	0,5364
B5 (1)	184,9	5413	193,70	2707,39	0,8816	0,003698	0,9173	0,3473
B5 (2)	202,5	1,786			0,953	0,6909		
B6 (1)	166	280,7	145,65	219,65	0,8282	0,4702	0,8340	0,6177
B6 (2)	125,3	158,6			0,8398	0,7652		
B7 (2)	120,1	93,97	102,15	90,52	0,7771	0,7551	0,7993	0,7343
B7 (3)	101	77,29			0,7998	0,7078		
B7 (4)	85,36	100,3			0,8209	0,74		
B8 (1)	249,7	974,8	232,30	603,20	0,8133	0,2043	0,8440	0,4535
B8 (2)	214,9	231,6			0,8747	0,7026		
B9 (1)	154,4	60,69	188,90	107,80	0,8713	0,8914	0,8818	0,9156
B9 (2)	223,4	154,9			0,8922	0,9398		
B10 (1)	95,25	28,5	117,98	63,91	0,9497	0,9346	0,9039	0,8734
B10 (2)	140,7	99,31			0,858	0,8121		
B11 (1)	147,2	219,9	111,57	239,85	0,932	0,7166	0,9478	0,8147
B11 (2)	75,94	259,8			0,9636	0,9128		
B12 (1)	82,13	24,41	90,23	40,24	0,9123	0,9243	0,8904	0,8928
B12 (2)	98,32	56,07			0,8684	0,8612		

Zone Toxique

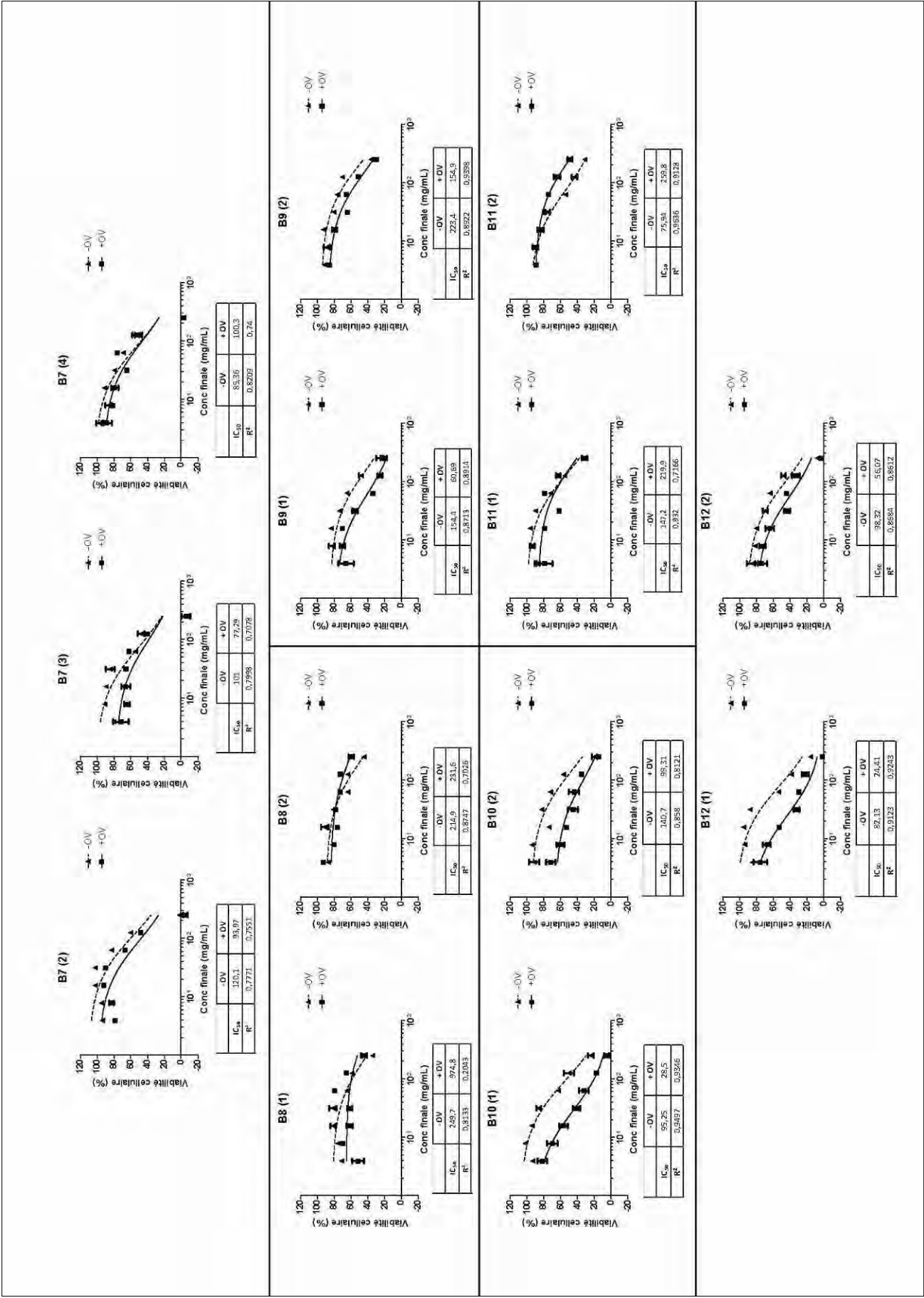
Zone Non Toxique

Valeur non validée

Graphiques des bénitiers de la zone toxique, obtenus avec GraphPad Prism®



Graphiques des bénitiers de la zone non toxique, obtenus avec GraphPad Prism®



ANNEXE 6

Résultats des extractions

Extraction de masse (bénitiers)

Bénitier	Masse broyée (g)	Masse sèche (g)	Masse résidu 1 (g)	Toxine Lipo (mg)	Toxine Cyclo (mg)	Toxine Hydro (g)
L15 B1	112	28,5	16,6	85,5	536,2	4,7106
L15 B2	142,5	29,5	19,8	146,5	643,3	6,9663
L15 B3	82,1	15,7	10,5	78,7	259	non lyophilisé
L15 B4	156,8	28,5	21,2	102,8	752,9	7,504
L15 B5	131,5	24,3	19,0	120,1	487,1	3,5863
L15 B6	396	73,8	57,4	577,1	3109,4	12,6781
L15 B7	32,5	7,8	4,4	54,1	117	0,8423
L15 B8	34,4	7,2	5,5	75,2	214	1,1608
L15 B9	8,6	1,9	1,2	34,4	55,7	0,4155
L15 B10	19	5,8	4,6	39,5	122,6	0,9843
L15 B11	27,7	5,3	3,8	58,7	157,6	0,9293
L15 B12	19,7	3,8	2,7	35,8	154,4	0,9128

= provenant de la zone toxique

= provenant de la zone non toxique

Extraction rapide (poissons)

Poissons	MTXs récupérées (mg)	CTXs récupérées (mg)
L15 P1 a	49,2	5,1
L15 P1 b	67,1	7,2
L15 P2 a	64,6	7,1
L15 P2 c	73,1	9,8
L15 P3 a	60,8	6,8
L15 P3 c	76,7	9,2
L15 P4 a	47,5	6,6
L15 P4 c	64,9	10
L15 P5 a	80,6	9,2
L15 P5 c	86,2	15,5
L15 P6 a	65,7	9,5
L15 P6 b	64,4	15,4
L15 P7 a	68,9	8,8
L15 P7 b	75	14,1
L15 P8 a	59,9	7,6
L15 P8 c	72,8	12,3
L15 P9 a	81,7	9,5
L15 P9 b	75,1	9

Poissons	Masse broyée (g)
L15 P1	56,3
L15 P2	93,8
L15 P3	130,8
L15 P4	53,6
L15 P5	31
L15 P6	88,6
L15 P7	73
L15 P8	30,8
L15 P9	53,8

ANNEXE 7

Equation: log(inhibitor) vs. response

(d'après le manuel d'aide du logiciel) Introduction

Many log(inhibitor) vs. response curves follow the familiar symmetrical sigmoidal shape. The goal is to determine the EC50 of the inhibitor - the concentration that provokes a response half way between the maximal (Top) response and the maximally inhibited (Bottom) response.

This model assumes that the dose response curves has a **standard slope**, equal to a Hill slope (or slope factor) of -1.0. This is the slope expected when a ligand binds to a receptor following the law of mass action, and is the slope expected of a dose-response curve when the second messenger created by receptor stimulation binds to its receptor by the law of mass action. If you don't have many data points, consider using the standard slope model. If you have lots of data points, pick the variable slope model to determine the Hill slope from the data.

- Step by step

Create an XY data table. Enter the logarithm of the concentration of the inhibitor into X. Enter response into Y in any convenient units. Enter one data set into column A, and use columns B, C... for different treatments, if needed.

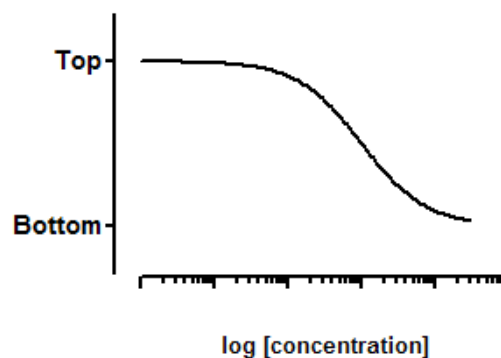
If you prefer to enter concentrations, rather than the logarithm of concentrations, use Prism to transform the X values to logs.

From the data table, click Analyze, choose nonlinear regression, choose the panel of equations "Dose-response curves - Inhibition" and then choose the equation "*log(inhibitor) vs. response*".

If you have subtracted off any basal response, consider constraining Bottom to a constant value of 0.

- Model

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((X - \text{LogIC50}))})$$



- Interpret the parameters

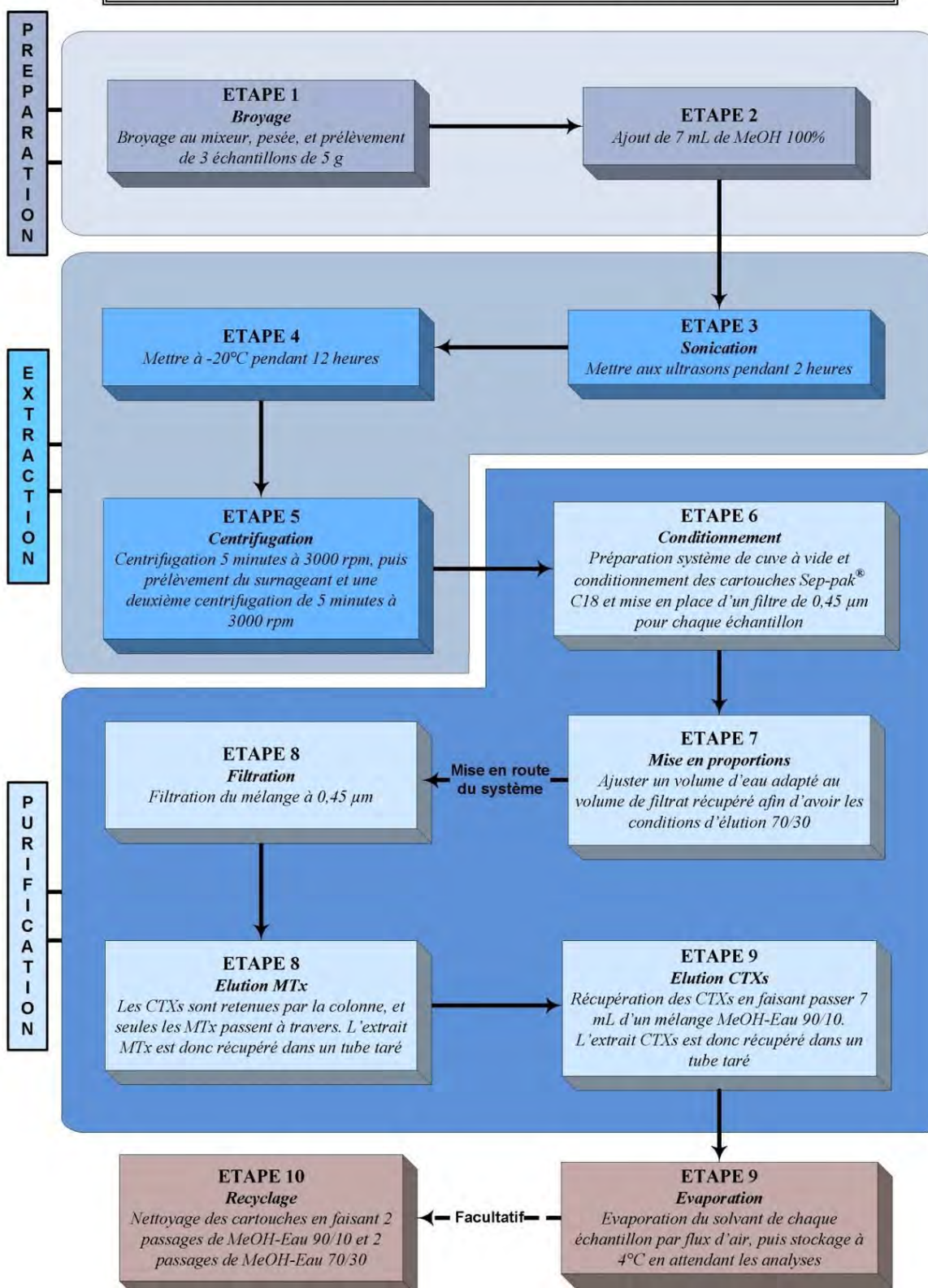
EC50 is the concentration of agonist that gives a response half way between Bottom and Top. This is not the same as the response at Y=50. Depending on which units Y is expressed in, and the values of Bottom and Top, the EC50 may give a response nowhere near "50". Prism reports both the EC50 and its log.

Top and **Bottom** are plateaus in the units of the Y axis.

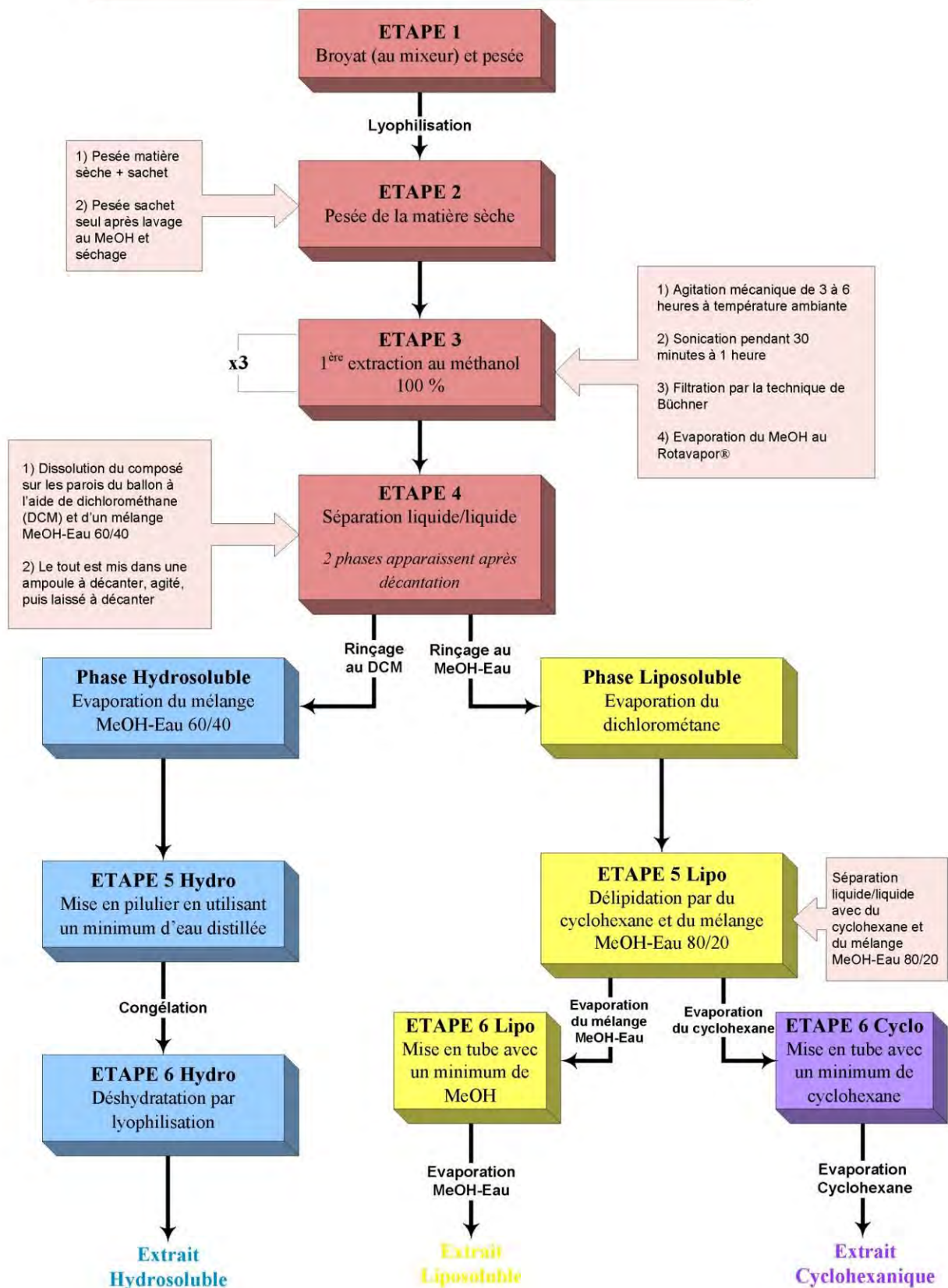
ANNEXE 8

Protocoles d'extraction sous forme de fiches pratiques

Protocole d'extraction rapide (protocole de Malarde)



Protocole d'extraction du bénitier (Endean 1993)



ANNEXE 9

Matériel utilisé



Bac à ultrason (Bioblock®)



Lyophilisateur (Christ®
Gamma 1-20)



Evaporateur rotatif (Büchi
Rotavapor® R-114)



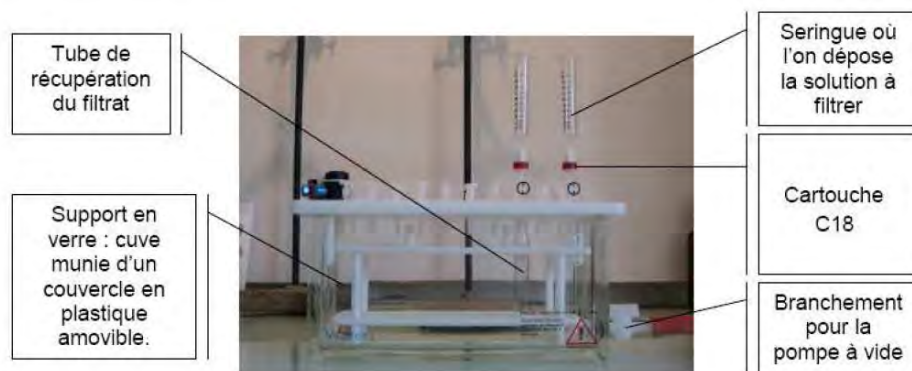
Lecteur de plaque Universal
Microplate Reader ELx 800™
(BioTek Instruments INC.)



Evaporateur sous flux d'air
(Techne®, dri block)



Hotte à flux laminaire (ESI-
FLUFRANCE® - Européenne



Kit d'extraction rapide (cuve en verre Waters®)

RESUME

De 2001 à 2005, de nombreux cas d'intoxications semblables à la ciguatéra ont été rapportés dans une tribu de Lifou (Province des Iles Loyautés, Nouvelle-Calédonie). La consommation de bénitiers (*Tridacna* spp.) ou de poissons en était la cause. Une inefficacité apparente des remèdes traditionnels a été constatée. De ce fait, à partir de 2005, un suivi épidémiologique et un suivi écotoxicologique a été mis en place sur la zone concernée. La surveillance de la zone corallienne endommagée a révélé la présence d'importantes populations de cyanobactéries identifiées comme appartenant au genre *Hydrocoleum*, mais l'absence de *Gambierdiscus* spp., le bien connu dinoflagellés agent causal de la ciguatéra. Ce stage s'inscrit donc dans la continuité du suivi écotoxicologique qui a été mis en place depuis 4 ans. Le potentiel toxique des bénitiers est évalué par tests de toxicité (test de cytotoxicité et test « souris ») après extraction chimique des toxines potentiellement présentes.

Mots-clés : ciguatéra, bénitiers, cyanobactéries, suivi écotoxicologique, extraction chimique

ABSTRACT

From 2001 to 2005, many cases of intoxications similar to ciguatera were reported in a tribe of Lifou (Loyalty Islands Province, New Caledonia). The consumption of giant clam (*Tridacna* spp.) or of fish was the cause. An apparent inefficiency of the traditional remedies was reported. So as from 2005, a survey of the toxic area has been carried out, and an ecotoxicological monitoring was set up. The study of the damaged coral zone revealed the presence of important populations of cyanobacteria belonging to the genus *Hydrocoleum*, but the absence of *Gambierdiscus* spp., the dinoflagellate well-known as the causal agent of ciguatera. This training course thus fits in the continuity of the ecotoxicological monitoring which has been set up for 4 years. The potential toxicity of giant clams has been evaluated by toxicity tests (cytotoxicity test and mouse bioassay) after chemical extraction of the toxins potentially present.

Keywords: ciguatera, giant clams, cyanobacteria, ecotoxicological monitoring, chemical extraction