

**Stage d'application industrielle
dans le domaine de la recherche
5^{ème} année de pharmacie**

Rapport de stage

Présenté par

Vincent ARNOLD
2005

**Implication des cyanobactéries dans les
intoxications de type ciguatérique et mise
en place d'une prévention adaptée en cas
de risques élevés d'intoxications**

Sous la direction scientifique de **Dominique LAURENT**

Laboratoire d'accueil :

**Institut de Recherche pour le Développement (IRD)
De Nouméa (Nouvelle-Calédonie)**

**UMR 152 « Pharmacochimie des Substances Naturelles
et Pharmacophores Redox »**



Faculté de Pharmacie
Université Paris Sud XI



IRD
Institut de recherche
pour le développement

Remerciements

Je remercie, en premier lieu, Fabrice Colin, directeur de l'IRD, pour m'avoir accueilli au centre IRD de Nouméa.

Je remercie aussi tout particulièrement Dominique Laurent pour son encadrement, sa sympathie et la confiance qu'il a bien voulu m'accorder tout au long de la réalisation de ce rapport, ainsi que l'UMR152, Maryvonne Frostin, Alain Videault, Antoine Holué et Nicolas Lebouvier pour leur soutien technique et leurs conseils.

Un très grand merci à Anne-Sophie Kerbrat, qui, par sa joie de vivre, sa générosité et sa sympathie, a participé au bon déroulement de ce stage.

J'adresse aussi mes remerciements à tous ceux qui ont participé à la réalisation de mon projet en Nouvelle-Calédonie, c'est à dire Martine Belouet, Marie-Noelle Segura, Monsieur Hocquemiller et Monsieur Tchoreloff.

J'aimerais adresser à Delphine Franko et Serge Pauillac mes remerciements les plus sincères pour leur accueil à l'Institut Pasteur, pour tous les conseils et surtout pour tout le temps qu'ils m'ont consacré lors de ma formation sur le protocole de culture cellulaire.

Avec un grand plaisir, je souhaite également faire un petit clin d'œil à tous les étudiants du loft pour leur accueil convivial, leur respect de la vie en communauté, leur aide et leurs fêtes au faré, qui m'ont permis de profiter et d'apprécier les petits plaisirs de la Calédonie.

Je termine par tout le personnel de l'Institut qui m'a accueilli très chaleureusement.

Sommaire

<i>Introduction</i>	<i>4</i>
Définition et historique	4
Incidence et distribution	4
Tableau clinique	5
Traitements	6
Implication des microorganismes.....	7
Biogénèse et chaîne trophique de la ciguatera.....	9
Multiplicité des toxines mises en jeu	11
Impacts de la ciguatera	12
<i>Cadre et présentation du sujet.....</i>	<i>13</i>
Lifou (étude rétrospective) :	13
Prony (étude prospective) :	14
<i>Etude rétrospective à Lifou</i>	<i>15</i>
Problématique	15
Préparation des extraits	15
Analyse de la toxicité	18
<u>Test biologique de toxicité aiguë sur souris :.....</u>	<u>18</u>
<u>Chromatographie sur Couche Mince comparative :</u>	<u>25</u>
<u>Le test de cytotoxicité cellulaire :.....</u>	<u>32</u>
Conclusion.....	36
<i>Etude prospective à Prony.....</i>	<i>37</i>
Problématique	37
Choix des sites de prélèvement	37
Prélèvements de microorganismes	38
Résultats	39
Discussion-Perspectives	39
<i>Conclusion</i>	<i>40</i>
<i>Bibliographies</i>	<i>41</i>

Introduction

Définition et historique

L'intoxication ciguatérique fait partie des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC). En tant que telle, elle doit faire l'objet d'une déclaration obligatoire à l'autorité sanitaire du département où le repas a été consommé (Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales ou Direction des Services Vétérinaires). Un recensement des informations relatives aux intoxications d'origine marine est parfois effectué par d'autres instances, comme la Commission du Pacifique Sud dans cette région (Annexes 1a et 1b).

La ciguatera est une intoxication consécutive à l'ingestion de poissons tropicaux connus pour être comestibles et en parfait état de fraîcheur.

Cette forme d'ichtyosarcotoxisme était déjà connue des grands navigateurs tels que Cook ou Magellan. Mais le terme « ciguatera » n'apparaît qu'en 1866, grâce à l'ichtyologue Poey qui l'emploie pour définir une intoxication alimentaire causée par un gastéropode marin « cigua » (*Livona pica*). Le terme a ensuite été étendu à toutes intoxications présentant des symptômes gastro-intestinaux et neurologiques résultant de l'ingestion de poissons.

Incidence et distribution

Cette intoxication alimentaire d'origine marine est rapportée comme la plus commune à l'échelle mondiale : son incidence annuelle est estimée à 25 000 (Fenner & Lewis, 2001) voire 50 000 cas mondiaux, avec 500 cas/100 000 habitants pour la région Pacifique Sud (Vaillant *et al.*, 2001). Selon Fenner & Lewis (2001), cette incidence ne représenterait que 20% des cas effectivement reportés et correctement diagnostiqués. D'autre part, bien que la ciguatera soit souvent considérée comme une affection non mortelle, son taux de mortalité dans le monde s'élève à 0,1-10% (ce taux pouvant atteindre 20% lors de flambées isolées, exemple : consommation de requins à Madagascar).

La ciguatera sévit de manière endémique dans la plupart des écosystèmes coralliens des zones intertropicales. On la trouve en mer des Caraïbes, océan Pacifique sud et central et dans l'océan Indien (Figure 1).

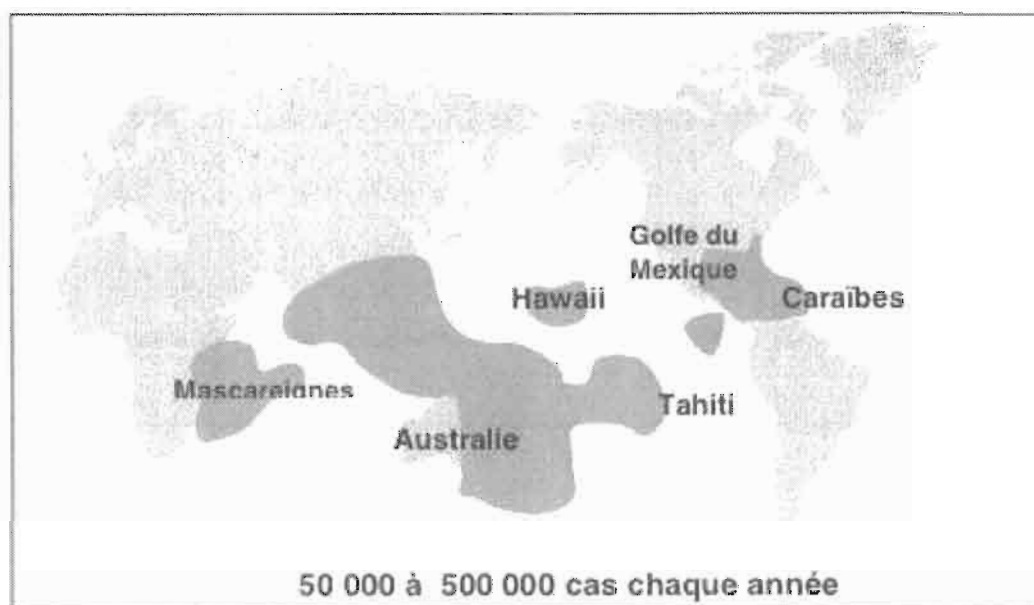


Fig. 1 : Répartition mondiale de la ciguatera (Ragelis, 1984 dans Quod & Turquet, 1996)

Tableau clinique

Le tableau clinique de la ciguatera est complexe et varié, ce qui pose problème en matière de diagnostic. Les premiers symptômes de la maladie apparaissent 2 à 12 heures après le repas. Les troubles engendrés sont de quatre types :

- Gastro-intestinaux : nausées, vomissements, diarrhées ;
- Neurologiques : troubles de la sensibilité (picotements autour des lèvres et du nez, fourmillements des mains et des pieds, sensations de brûlure au contact de l'eau froide), démangeaisons, maux de tête, sueurs, frilosité, fatigue ;
- Cardio-vasculaires : hypotension, bradycardie ;
- Musculaires et articulaires.

En dépit d'une large répartition géographique de cette intoxication, les cas mortels sont rares. Les cas de fortes intoxications, qui sont exceptionnelles, peuvent provoquer des paralysies, le coma ou la mort.

Dans une grande majorité des cas, les troubles digestifs sont les seules manifestations. Les démangeaisons (prurit), également très fréquentes, sont à l'origine de différents synonymes du terme ciguatera tels que « la gratte » en Nouvelle-Calédonie ou « la gratelle » aux Antilles.

Le diagnostic peut être plus complexe selon la région géographique concernée où différents symptômes peuvent s'ajouter au tableau clinique habituel. Dans l'Océan Pacifique, ils sont surtout d'ordre neurologique alors que, dans les Caraïbes, ils sont d'ordre gastro-intestinal et dans l'Océan Indien, certains patients intoxiqués sont sujets à des hallucinations.

La majorité des cas de ciguatera évolue favorablement sans séquelles en une semaine. Les symptômes varient selon le lieu de pêche, la nature du poisson consommé, sa taille, la quantité et la partie du poisson ingéré et la sensibilité de l'individu. Cette sensibilité est fonction de l'état physiologique de la personne mais aussi de la quantité de toxines ayant pu être ingérées et emmagasinées lors de repas antérieurs. Certains symptômes peuvent persister pendant plusieurs semaines ou mois, ces derniers étant ravivés par des consommations ultérieures de fruits de mer ou de poissons, même sains, ou lors de prise d'alcool. Ceci évoque une hypersensibilité par rapport à ces produits alimentaires suite une intoxication ciguatérique.

Traitements

La consultation d'un médecin s'impose. En l'absence de traitement spécifique, la ciguatera reste un problème de santé publique. Il n'existe pas de traitement dans la médecine occidentale outre que symptomatique (le traitement est prescrit en fonction des signes cliniques présentés par le patient), en revanche la médecine traditionnelle est très riche.

Pour la prise en charge « occidentale » :

Les signes gastro-intestinaux s'apaisent en général assez vite de façon spontanée, mais peuvent être soulagés par des spasmolytiques, anti-émétiques et/ou anti-diarrhéiques classiques. Une prise en charge hospitalière n'est nécessaire qu'en présence de désordres hydroélectrolytiques importants. L'état d'hydratation est donc à vérifier, particulièrement chez les sujets à risque (enfants et sujets âgés).

Les signes liés à une composante nociceptive de la douleur (céphalées, myalgies et arthralgies) peuvent être traités par des antalgiques de niveau I voire de niveau II. Les antihistaminiques sont proposés dans le traitement du prurit.

Une antibiothérapie locale peut être nécessaire en cas de surinfection des lésions de grattage.

Dans les formes avec atteinte cardiovasculaire, l'atropine est utilisée pour traiter les bradycardies. En cas d'hypotension marquée, une correction peut être effectuée par un remplissage par cristalloïdes voire hydroxyéthylamidon.

Dans le traitement des signes neurologiques, diverses thérapeutiques ont été utilisées. Lorsqu'une activité anticholinestérasique était tenue pour responsable de la ciguatoxicité, la néostigmine fut employée, avec un certain succès, dans les formes graves (Banner *et al.*, 1963). Devant la constatation d'une similarité de symptômes entre l'avitaminose B6 et la ciguatera, cette vitamine fut employée. Plus généralement, les vitamines B1, B6 et B12 à fortes doses, ainsi que le gluconate de calcium à 10%, furent souvent utilisées par voie intraveineuse (i.v.). L'utilisation de corticoïdes par cette voie est également reportée : la méthylprednisolone en particulier (Stommel *et al.*, 1993). L'utilisation de stabilisateurs de membrane a également été proposée. La lidocaïne, qui bloque les canaux sodium sensibles au potentiel de membrane, s'est montrée efficace par voie parentérale pour contrer les effets cardiovasculaires de la ciguatoxine chez le chat (Legrand *et al.*, 1985). Chez l'homme, trois cas traités par son analogue actif *per os*, le tocaïnide, ont vu leurs signes neurologiques disparaître en deux semaines (Lange *et al.*, 1988).

Dans les formes chroniques, l'amitriptyline, à la dose de 25 mg toutes les 12 ou 24 heures, ou la nifédipine, à 10 mg toutes les 8 heures, ont également été proposées (Calvert *et al.*, 1987) mais ont montré une efficacité incomplète et inconstante. La gabapentine a été utilisée avec succès dans le traitement de la douleur et des paresthésies des formes chroniques. Cependant les symptômes sont réapparus rapidement à l'arrêt du traitement, nécessitant sa prolongation (Perez *et al.*, 2001). Le D-mannitol hyperosmotique est cité très fréquemment comme traitement d'urgence des formes neurologiques et/ou graves de ciguatera (Ruff & Lewis, 1994). Utilisé par voie i.v. en solution à 20%, à raison de 1 g/kg sur 30 à 60 minutes, il est souvent réservé aux formes justifiant une hospitalisation. Son mécanisme d'action reste incomplètement connu.

Cependant, les hypothèses d'une diminution de l'affinité de la ciguatoxine pour les canaux sodium ou d'une action par piégeage de radicaux libres ont pu être écartées (Ruff & Lewis, 1994). C'est, en partie, son effet osmotique qui semble expliquer son action (Mattei *et al.*, 1997). Cet effet, amenant la réduction de l'œdème des cellules de Schwann (Ruff & Lewis, 1994), pourrait ainsi expliquer l'amélioration des symptômes neurologiques, observée s'il est administré dans les 48 premières heures suivant l'intoxication. Cependant, le bénéfice apporté par ce traitement est inconstant. D'autre part, l'étude menée en double aveugle par Schnorf *et al.* (2002), comparant l'effet du mannitol à celui du sérum salin isotonique, conclut à une amélioration de la symptomatologie non significativement différente sur 24 heures. L'utilisation du D-mannitol par voie intraveineuse reste pourtant le traitement de choix dans les formes graves, après correction de l'éventuelle déshydratation due aux pertes digestives que pourrait aggraver ce diurétique.

Pour la médecine traditionnelle :

De nombreux remèdes à base de plantes sont utilisés contre « la gratte » et près de 80 plantes, utilisées dans le Pacifique ouest, ont été recensées (Bourdy *et al.*, 1992 ; Laurent *et al.*, 1993). Parmi ces remèdes, l'infusion des feuilles d'*Argusia argentea*, dénommé faux tabac en Nouvelle-Calédonie, y est populairement employée pour traiter la ciguatera. Il fut d'autre part cité par Bagnis (1973) et Halstead (1978) comme l'un des remèdes les plus populaires dans le large Pacifique. Des études préliminaires ont montré que le remède pouvait réduire les effets de la ciguatoxine observés sur souris (Amade & Laurent, 1992) et sur axones myélinisés de grenouille (Benoit *et al.*, 2000).

Aussi, deux plantes, *Spondias cytherea* (pomme cythere) et *Syzygium malaccense* (pommier canaque) semblent particulièrement intéressantes contre les intoxications ciguatériques.

Implication des microorganismes

C'est en 1976 que l'agent causal de la ciguatera, le dinoflagellé *Gambierdiscus toxicus* (Adachi & Fukuyo, 1979). (Figure 2), algue unicellulaire, a été identifié pour la première fois, à l'occasion d'une flambée de ciguatera aux îles Gambiers (Archipel des Tuamotu-Gambiers, Polynésie Française). Il appartient à la Famille des Goniodomataceae, Ordre des Peridiniales, Classe des Dinophyceae et à l'Embranchement des Pyrrophyta (Adachi & Fukuyo, 1979). Ce dinoflagellé

benthique est capable de nager autour des thalles de macroalgues formant un gazon dense sur les pâtés coralliens, et s'y fixent lors de fortes turbulences (Nakahara *et al.*, 1996).

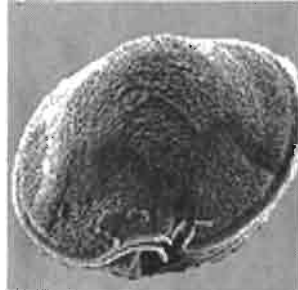


Fig. 2 : Microscopie à balayage d'une cellule de *Gambierdiscus toxicus* (taille : 40 μm).

Source : <http://www.nmnh.si.edu/botany/projects/algae/Rabst-12.htm>

Depuis 1976, cinq autres espèces de *Gambierdiscus* ont été décrites à travers le globe : *G. belizeanus* endémique aux îles Belize (Faust, 1995), *G. yasumotoi* isolée à Singapour (Holmes, 1998) et plus récemment *G. australes*, *G. polynesiensis* et *G. pacificus*, trois espèces endémiques aux eaux polynésiennes. Mais toutes les espèces de *Gambierdiscus* ne sont pas toxiques, et parmi celles qui le sont (*G. toxicus*, *G. yasumotoi* et *G. polynesiensis*), il existe une grande variabilité intraspécifique dans la production de toxines. Il existe différentes souches d'une même espèce qui présentent des niveaux de toxicité différents sans que cela semble être fonction des facteurs du milieu (Chinain *et al.*, 1999b).

Le genre *Gambierdiscus* constitue un élément commun des mangroves et des régions coralliennes mais il n'entraîne la ciguatera que lors d'une prolifération massive épisodique conduisant à une efflorescence toxique (Legrand & Bagnis, 1991).

Une particularité du phénomène ciguatera est sa variabilité dans le temps et dans l'espace ; en d'autres termes, une zone touchée par la ciguatera peut redevenir progressivement atoxique, ou une zone habituellement indemne de ciguatera devenir toxique.

D'après les données bibliographiques, les cyanobactéries sont également suspectées d'être une source de toxines, dans la chaîne alimentaire pisciaire, pouvant conduire à des empoisonnements chez l'homme (Endean *et al.*, 1993). Un composé létal aux souris, en injection intrapéritonéale, a été extrait d'échantillons de *Trichodesmium erythraeum* et de quatre espèces de mollusques. Les études chromatographiques et les symptômes enregistrés chez la souris sont en faveur de substances proches des ciguatoxines (Hahn et Capra, 1992).

Alors que l'implication des dinoflagellés dans le phénomène ciguatérique est établie, celle des cyanobactéries reste encore à prouver.

Biogénèse et chaîne trophique de la ciguatera

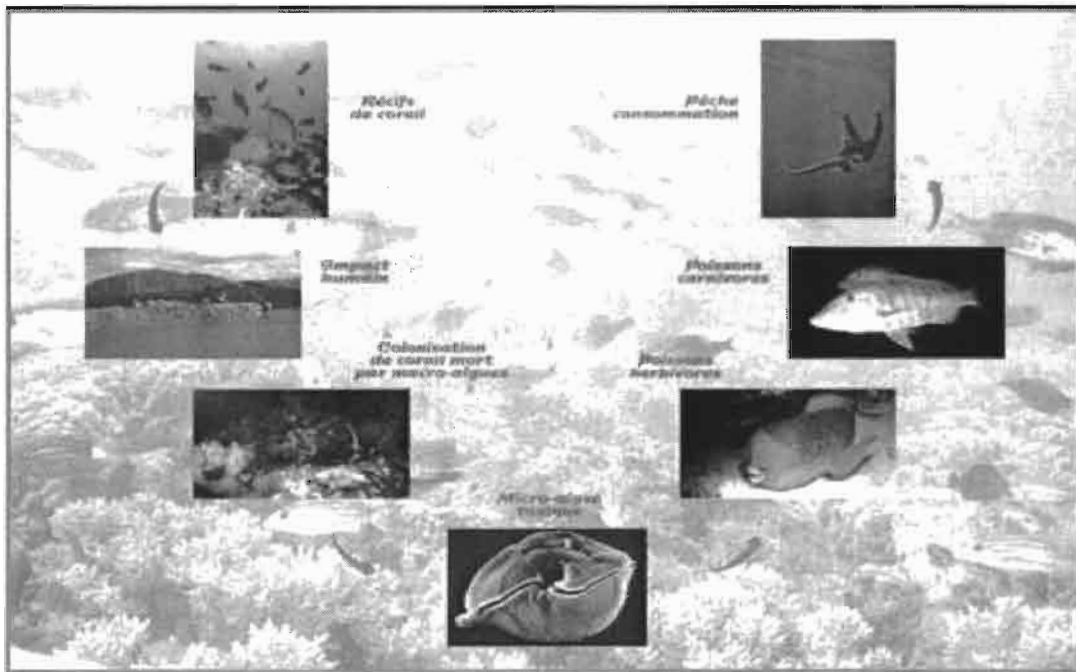
Malgré le manque d'information concernant le rôle des facteurs environnementaux sur le développement des efflorescences, de nombreuses études en Polynésie (Bagnis 1969, 1973, 1994, Tebano et Lewis 1991) ont montré la relation de cause à effet entre les perturbations exercées sur les récifs et les flambées ciguatériques. Ces perturbations, à l'origine du phénomène ciguatera, peuvent être aussi bien naturelle (cyclones, tsunamis, blanchissement des coraux) qu'anthropique (pollution, travaux d'aménagement). En effet, tout phénomène causant une dégradation du milieu corallien est susceptible d'entraîner une flambée de ciguatera dans la zone détériorée. L'environnement a donc une importance considérable dans les flambées ciguatériques.

Le corail, une fois mort, devient en effet un substrat idéal pour le développement de macroalgues qui, à leur tour, seront colonisées par toute une microflore associée. Parmi celle-ci, les microalgues toxiques responsables de la ciguatera sont ainsi retrouvées au sein de macroalgues : *Jania*, *Turbinaria*, *Halimeda* et *Sargassum* (espèces dites « branchues fréquentes dans les écosystèmes coralliens calédoniens »). La prolifération des microalgues peut, en effet, être largement favorisée par la création de « nouvelles surfaces » colonisables par des macroalgues opportunistes, substrats-hôtes de ces dinoflagellés (Bagnis, 1994, Chinain *et al*, 1999a).

Les toxines produites par ces microalgues (Dinoflagellés du genre *Gambierdiscus*) s'accumulent au niveau des poissons herbivores lorsque ces derniers viennent brouter les macroalgues recouvrant les coraux morts. Elles sont ensuite transmises au maillon trophique supérieur représenté par les poissons carnivores par prédation de ces derniers sur les poissons herbivores. L'Homme, dernier maillon de cette chaîne trophique, s'intoxique en consommant l'un ou l'autre de ces poissons (Figure 3).

On estime à environ 2 à 4 semaines le délai nécessaire pour que les toxines produites par les cellules de *Gambierdiscus* à l'occasion d'une efflorescence, se retrouvent dans les chairs des poissons herbivores inféodés à la zone de prolifération de la microalgue.

Fig. 3 : Schéma du cycle de l'intoxication ciguatérique. Source : Ifreco.



La transmission de la ciguatera s'effectue donc essentiellement par la voie pisciaire, rares en effet sont les cas d'intoxications causés par des Invertébrés.

Plus de 110 espèces de poissons, réparties à travers le monde, ont été scientifiquement rapportés comme ayant une fois été ciguatoxique (Boydrón-Le Garrec *et al.*, *sous presse*). Ce sont les espèces récifales de haut niveau trophique qui sont, en très grande majorité, les plus incriminées. Dans l'océan Pacifique, il s'agit surtout de familles de carnivores telles que les Lutjanidae (lutjan, anglais), les Muranidae (murènes), les Serranidae (loches), les Sphyranidae (barracudas), les Carangidae (carangues) et les Scombridae (tazard). Bagnis (1973), cite, en Polynésie Française, des cas d'intoxication provoqués par d'autres familles telles que les Acanthuridae (chirurgiens), les Scaridés (perroquets), les Mullidae (barbillons), les Haemulidae (grosses lèvres), les Mugilidae (mulets), les Lethrinidae (becs de canne), les Labridae (napoléons) et les Balistidae (balistes). Les gros spécimens de certaines de ces espèces sont aussi potentiellement toxiques en Nouvelle-Calédonie (Boydrón-Le Garrec *et al.*, *sous presse*).

Par bioaccumulation le long de la chaîne alimentaire, les toxines initialement produites par la microalgue vont se concentrer dans les poissons pour atteindre chez les plus âgés des taux susceptibles d'intoxiquer les consommateurs.

Multiplicité des toxines mises en jeu

Maïtotoxines et ciguatoxines

Les cellules de *Gambierdiscus* sont capables de synthétiser 2 types de composés toxiques : des ciguatoxines (ou CTXs) et des maïtotoxines (ou MTXs), toutes deux des polyéthers polycycliques complexes.

La présence de MTXs dans la chaîne alimentaire a été mise en évidence pour la première fois par Yasumoto en 1976, dans le tractus digestif du chirurgien noir *Ctenochaetus striatus* (« maito » en tahitien), poisson herbivore dont les viscères sont particulièrement appréciés par certains Polynésiens. Ces toxines hydrophiles, au poids moléculaire élevé (3422 Da) ont vu leur structure élucidée par Murata entre 1992 et 1993 (Murata *et al.*, 1992; 1993). Ne s'accumulant que dans les viscères de poissons herbivores, les MTXs ne sont jamais présentes chez les poissons carnivores et affectent ainsi rarement l'Homme. Elles ne sont donc pas considérées comme directement responsables de la ciguatera.

C'est en 1958 que Banner et Borough (1958) mettent en évidence l'existence de la CTX dans la chair de *Lutjanus bohar* (lutjan rouge). C'est l'équipe de Scheuer qui, en 1967, réalisera son isolement chimique à partir de la murène javanaise *Gymnothorax javanicus* (Scheuer *et al.*, 1967). Les CTXs forment le principe pathogène majeur de la ciguatera. Elles sont liposolubles, i.e. solubles dans les solvants organiques polaires et transparentes aux UV. De part leur grande stabilité thermique, ni la cuisson ni la congélation n'altèrent ces toxines (Bagnis, 1981). Elles ne confèrent ni odeur, ni goût particulier aux aliments intoxiqués, les rendant indétectables pour le consommateur. Par contre, leur dégradation est rapide en milieu acide, à l'air et la lumière (Bagnis, 1981).

Il existe trois sortes de ciguatoxines de structures différentes : les ciguatoxines du Pacifique (P-CTXs), celles des Caraïbes (C-CTXs) et celles de l'océan Indien (ICTXs). Cette diversité toxinique est vraisemblablement à l'origine des différences de symptômes observés d'une région à l'autre.

Outre cette diversité géographique, on observe également une diversité des toxines le long de la chaîne alimentaire, qui s'explique par le phénomène de biotransformation que subissent les CTXs algales lors de leur accumulation aux différents niveaux trophiques (près d'une vingtaine d'analogues connus chez les seules P-CTXs). Cette biotransformation consiste en une oxydation progressive des CTXs, des herbivores vers les carnivores, rendant ces toxines à la fois plus actives et plus toxiques (Lehane & Lewis, 2000). On évoque ainsi la notion de « profils toxiques » spécifiques à chaque étage trophique. Toutefois, certaines toxines, telles que la P-CTX-3C, sont parfois retrouvées à tous les niveaux trophiques, faisant d'elles des cibles privilégiées pour les tests de détection en cours de développement. La synthèse totale de la P-CTX-3C a été réalisée en 2001 par l'équipe japonaise de Hiram (2001) avec un perfectionnement de la technique en 2004 par l'équipe de Inoue (2004).

Cyanotoxines

L'implication des cyanotoxines dans la santé humaine provient généralement d'informations épidémiologiques qui résultent de l'étude de populations humaines ayant montré des signes d'empoisonnement ou de blessure attribuées à la présence de cyanotoxines dans l'eau douce (boisson et baignade). L'établissement d'une corrélation épidémiologique dépend d'une bonne définition des cas, d'une caractérisation précise de l'exposition et d'une base de données qui permet la comparaison des données. La plupart des cas d'intoxications attribuées aux cyanobactéries ont été étudiés rétrospectivement et des données épidémiologiques complètes, particulièrement pour ce qui concerne l'exposition (nombre de cas, type et concentrations des cyanotoxines), sont rarement disponibles. Néanmoins, l'analyse épidémiologique est très importante pour démontrer directement le lien entre l'exposition aux toxines et la santé humaine, ce qui ne peut être le cas avec les seules expérimentations animales.

Parmi toutes les cyanotoxines connues, les peptides cycliques sont ceux qui concernent plus directement la santé humaine du fait des risques potentiels d'exposition à long terme à de faibles concentrations de toxines dans l'approvisionnement en eau de boisson (toxines d'eau douce). Les peptides cycliques, microcystines et nodularines, sont ainsi des poisons spécifiques du foie chez les mammifères.

Les neurotoxines alcaloïdiques, telles que l'anatoxine et la saxitoxine (toxine à PSP pour « Paralytic Shellfish Poisoning », provoquent également des effets aigus chez les mammifères. Alors qu'il y a un grand nombre d'informations publiées sur la toxicité de la saxitoxine chez l'homme et les mammifères, les données animales sont rares pour l'anatoxine chez les mammifères et complètement inexistantes pour son action sur l'homme. La saxitoxine est une cyanotoxine hydrosoluble et thermostable dont les effets sont connus chez l'homme. Ils peuvent aller d'une sensation de picotement, de vertige et de nausée jusqu'à une paralysie et des troubles respiratoires entraînant la mort. Les intoxications humaines sont généralement dues à la consommation de mollusques filtreurs (coquille St-Jacques, moules) contaminés (toxines marines). Les symptômes provoqués par ces neurotoxines peuvent être difficile à distinguer de ceux provoqués par les ciguatoxines, étant donné la très forte variabilité individuelle que présentent les intoxications ciguatières.

Impacts de la ciguatera

Les impacts de la ciguatera sont surtout ressentis dans l'Océan Pacifique. Cette région regroupe, en effet, une multitude de petites îles pour les habitants desquelles les ressources pisciaires constituent la principale source protéique. Dans certains pays du Pacifique, l'apport en poissons récifaux serait supérieur à 100 g par jour (Lewis & Ruff, 1993), ce qui explique que la ciguatera y soit perçue comme un véritable problème de santé publique. Le SEPEHIS (South Pacific Epidemiological and Health Service) classe la ciguatera comme la maladie la plus répandue dans cette zone (Lewis & Ruff, 1993). Cette maladie provoque une forte morbidité, et occasionne d'importantes dépenses médicales (Diogène *et al.*, 1992).

La santé des populations de la région Pacifique est aussi touchée de manière indirecte par ce phénomène puisqu'il faut compenser cet unique apport protéique par l'importation de 90% des poissons consommés dans certains pays (Lewis & Ruff, 1993). Cette modification du régime alimentaire est associée à des apports excédentaires en sel et en graisse qui favorise ainsi l'apparition de maladies chroniques telles que le diabète, la goutte ou l'hypertension (Lewis & Ruff, 1993). Par ailleurs, le commerce et la pêche des pays touchés par la ciguatera s'en trouvent également lésés, les poissons impropres à la consommation n'étant plus exportables (Diogène *et al.*, 1992). Enfin, les intoxications de touristes contribuent à entacher l'image du pays en tant que destination touristique (Lewis & Ruff, 1993). Aujourd'hui, la ciguatera n'est plus confinée aux seules régions coralliennes. En effet, avec le développement des exportations de poissons récifaux, la maladie touche de plus en plus de nations, prenant une ampleur mondiale.

Cadre et présentation du sujet

Cette étude sur les risques ciguatériques portent sur deux sites (Annexe 2) :

Lifou (étude rétrospective) :

Répondant à l'alerte sanitaire de la Province des îles concernant de nombreux cas d'intoxications de type ciguatérique dans l'île de Lifou (Iles Loyautés, Nouvelle-Calédonie), des experts de l'IRD se sont rendus dans la tribu de Hunëtê concernée pour tenter d'apporter une réponse aux populations quant à l'apparition de ces intoxications.

Lors de cette mission d'expertise menée dans cette tribu de Lifou en 2004, l'observation de la zone identifiée comme toxique par les pêcheurs locaux a montré une surface totalement détruite sur près de 300 mètres et ceci sans doute à la suite du recouvrement des coraux par l'éboulement d'une route. Les coraux morts sont recouverts d'un gazon encroûtant et par de larges plaques de cyanobactéries filamenteuses noires (cyanobactéries du genre *Trichodesmium* ou *Hydrocoleum*). En revanche, aucune macroalgue et aucun échinoderme n'ont été trouvés, et l'analyse du gazon encroûtant n'a relevé la présence d'aucun dinoflagellé du genre *Gambierdiscus*. Ces données exposent donc une zone d'étude exceptionnelle, puisque ce type de toxicité par des *Trichodesmium erythreum* a juste été mentionné en 1992 par Hahn et en 1993 par Endean, sans aucun rapprochement épidémiologique et sans aucune étude précise des toxines responsables. La zone considérée comme non toxique est en revanche très riche en coraux vivants, en *Turbinaria* (phaeophycée) et en holothuries (*Stichopus Chloronotus*). L'analyse des *Turbinaria* a montré qu'ils supportaient une grande quantité de *Gambierdiscus*, signe d'une possibilité de flambées ciguatériques. Les premières études épidémiologiques font apparaître plusieurs dizaines de cas d'intoxication à la suite de consommation de poissons et de bœnitières pêchés dans la zone réputée toxique. La gravité des symptômes, pour certains intoxiqués, a nécessité leur hospitalisation à Nouméa. L'implication des cyanobactéries reste encore à prouver dans le phénomène ciguatera et est un enjeu majeur dans la compréhension du phénomène.

Prony (étude prospective) :

L'activité minière a fortement marqué l'histoire et le paysage de la Nouvelle-Calédonie et le secteur du nickel, clef de voûte de l'économie, dépasse le seul cadre économique et participe au développement social du pays. L'exploitation a commencé dès 1876 (soit un siècle après la découverte de la Nouvelle-Calédonie par James Cook en 1774) et l'histoire de la mine montre que plus de 500 sites miniers ont été jusqu'alors exploités (Ifreco). L'impact des mines à ciel ouvert sur l'environnement a rapidement pris de l'ampleur avec la mécanisation survenue après la seconde guerre mondiale. Cependant, les mines datant d'avant 1976, c'est-à-dire la majorité des exploitations, n'ont fait l'objet d'aucun contrôle environnemental, tandis que depuis cette date les exploitations en activité doivent obligatoirement faire l'objet d'une remise en état à terme. L'activité minière contribuant aux problèmes d'érosion et de sédimentation, des tentatives de revégétalisation ont été mises en place pour réduire l'impact sur l'environnement. Cependant, la majorité des plantes nickellifères (qui poussent sur les sols riches en nickel) du maquis minier sont endémiques à la Nouvelle-Calédonie et leur mode de reproduction est encore mal connu.

La société Goro Nickel, filiale de la société canadienne INCO (deuxième producteur mondial de nickel) possède depuis fin 1999, dans la région de Goro dans la baie de Prony sur la côte Ouest de la Province Sud (Grande terre, Nouvelle-Calédonie), une usine pilote pour le traitement hydrométallurgique des minerais latéritiques issus des gisements situés à proximité. Courant 2001, la société a eu l'autorisation de développer l'usine commerciale dont le démarrage et la production étaient prévus pour 2004-2005 et qui sont finalement envisagés pour 2007-2008. Les effluents vont être rejetés dans le canal de la Havannah, à environ 5 kilomètres de la côte par un diffuseur de 900 mètres de long situé à environ 35 mètres de profondeur. Une base-vie a été construite pour le personnel à côté de l'usine pilote. Un wharf (installation portuaire) a été construit à proximité, pour le transport des travailleurs et du matériel, ainsi qu'un tuyau pour l'écoulement des égouts de la base-vie.

La mise en place de ce projet industriel de grande envergure entraîne forcément une série d'impact sur l'environnement. C'est pourquoi suite aux données bibliographiques (Bagnis 1969, 1973, 1994, Tebano et Lewis 1991) et aux résultats de notre précédente étude à Lifou sur la relation entre les risques ciguatériques et les dégradations du milieu d'origine anthropique, il paraît extrêmement intéressant de mettre en place un suivi de la population des microorganismes susceptibles d'être toxiques dans la baie de Prony. Différents sites sont donc choisis au sein de la baie afin d'appliquer la même méthodologie qu'à Lifou (dénombrement des *Gambierdiscus* sp. et des cyanobactérie et analyse de la toxicité en cas d'efflorescence). Ceci nous permet d'établir un point zéro pour la mise en place ultérieure d'un suivi de ces populations.

Etude rétrospective à Lifou

Problématique

La sévérité des symptômes (confirmée par les médecins et les habitants de Hunëtë) montrent qu'ils ne correspondent pas à un épisode ciguatérique classique. La sévérité de certains cas d'intoxications observés chez l'homme (nécessitant une hospitalisation) peut être expliquée par la forte variation de la sensibilité individuelle aux ciguatoxines, et/ou par une éventuelle contamination des poissons, bivalves par des cyanotoxines.

Les cyanobactéries sont-elles responsables d'intoxications à caractère ciguatérique?

Est-ce que les intoxications par les bénitiers peuvent être qualifiées de ciguatériques et sont-elles dues à une filtration des cyanotoxines?

La présence de cyanobactéries est-elle saisonnière comme c'est le cas pour les *Gambierdiscus*, et empêche-t-elle l'agrégation des *Gambierdiscus* sur le substrat?

Des prélèvements de poissons (de la zone toxique et de la zone non toxique) (Figure 4), de bénitiers, d'exudats de cyanobactéries, de cyanobactéries et de dinoflagellés (ce dernier par le biais de *Turbinaria* sp) ont été réalisés lors de deux missions (du 15 au 17 mars 2005, le 28 avril 2005) à Lifou.

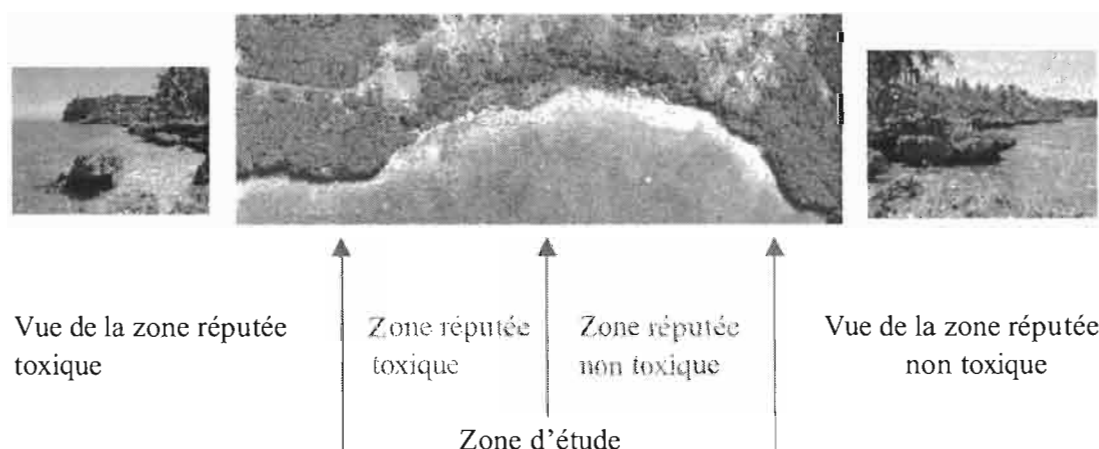
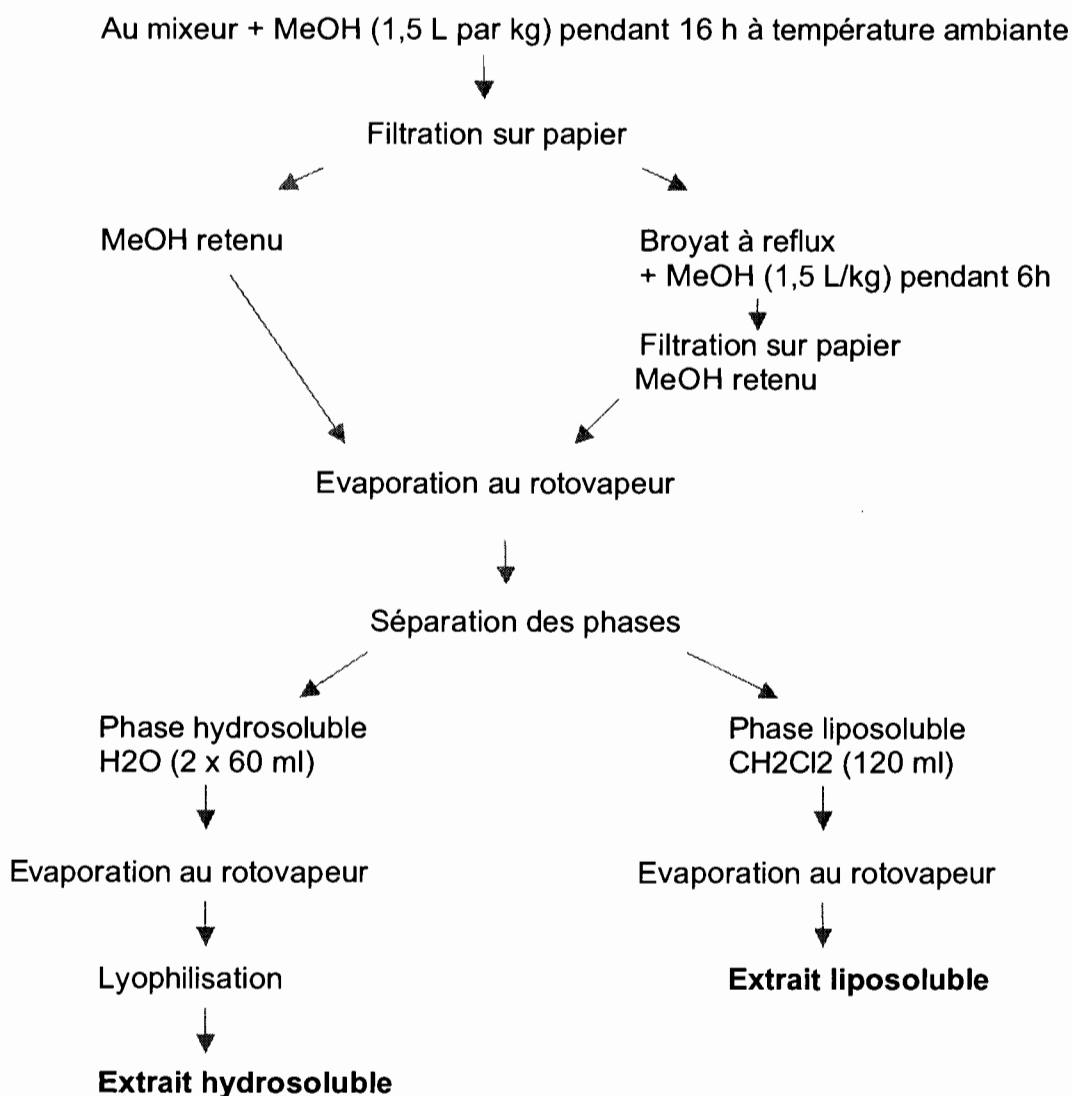


Fig. 4: Observation de la zone d'étude à Hunëtë. Source : DITTT (Direction des Infrastructures, de la Topographie et des Transports Terrestres) pour la vue aérienne et IRD pour les photographies.

Préparation des extraits

Les fractions à tester sont obtenues par extraction de la chair et du foie de poissons, par extraction des bénéitiers en entier (chair et viscères). Le protocole suivi, d'après Endean *et al* (1993), est décrit ci dessous :



Des extraits de murènes (en particulier *Gymnothorax javanicus*) du lagon et des récifs de Chesterfields et d'anglais (*Lutjanus bohar*) des Chesterfields ont été analysés. La P-CTX-1 semble être la ciguatoxine prédominante dans les poissons du lagon calédonien et des récifs de Chesterfields.

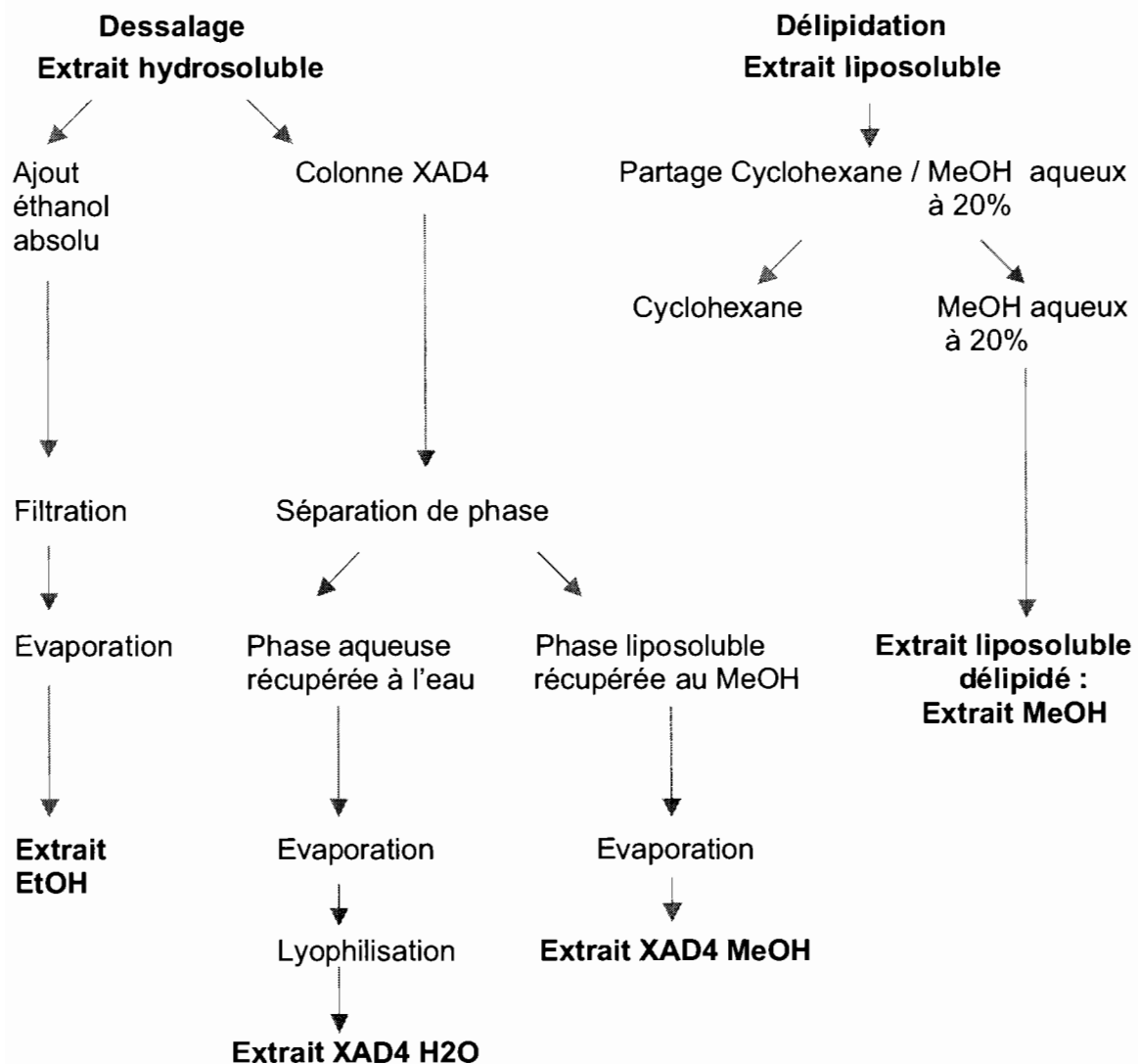
J'ai effectué ce type d'extraction sur des foies de murènes (FM) et d'anglais (FA). Ces poissons sont considérés comme nos témoins positifs, c'est-à-dire comme étant « gratteux ». Bien sûr, cette hypothèse sera vérifiée par la suite. Mais d'après celle-

ci, on devrait extraire les maïtotoxines dans nos extraits hydrosolubles de foies de murènes et d'anglais, et les ciguatoxines dans nos extraits liposolubles.

Ce type d'extraction a été aussi effectué, auparavant, sur des bénitiers, des chairs et foies de poissons perroquets (*Scarus* sp) pêchés le 28 avril 2005 dans les zones réputées toxique et non toxique. Cette extraction permet de séparer nos toxines hydrosolubles (maïtotoxines, cyanotoxines hydrosolubles comme la saxitoxine) de nos toxines liposolubles (ciguatoxines, cyanotoxines liposolubles qui sont proches des ciguatoxines) (Hahn et Capra, 1992).

De la même manière, une extraction de culot de *Gambierdiscus* sp. et de cyanobactéries issus des prélèvements du 15 au 17 mars 2005 est effectuée suivant respectivement le protocole de Chinain *et al* (1999a) et celui de Endean *et al* (1993).

Ensuite, pour concentrer nos extraits hydrosolubles et liposolubles, on effectue respectivement pour chacun d'entre eux, un dessalage et une délipidation :



Le dessalage est effectué sur tous les extraits hydrosolubles. On suppose que nos extraits hydrosolubles dessalés (extraits EtOH et extraits XAD4 MeOH) sont plus concentrés en toxines hydrosolubles (maïtotoxines, cyanotoxines hydrosolubles). D'après notre hypothèse, notre extrait XAD4 H₂O contient des sels. En effet, la résine XAD4 permet de retenir les ions. Et on considère qu'au passage de l'eau, l'affinité entre les toxines hydrosolubles et la résine XAD4 est plus forte que celle entre les sels et cette même résine. On récupère nos toxines par du méthanol que l'on verse dans la colonne.

J'ai effectué le dessalage sur les exudats de cyanobactéries («eau rouge» recouvrant le tapis de cyanobactéries accroché aux coraux morts, cette coloration est due aux substances hydrosolubles sécrétées par ces microorganismes) prélevés lors des deux missions (le prélèvement de mars 2005 correspond à Lifou 1, le prélèvement d'avril 2005 à Lifou 2), donnant les extraits L(1 ou 2) XAD4 MeOH et L(1 ou 2) XAD4 H₂O.

La délipidation est effectuée sur tous les extraits liposolubles. On concentre donc nos extraits liposolubles en toxines liposolubles (ciguatoxines, cyanotoxines liposolubles) retrouvées dans la phase méthanol aqueux. Dans notre phase cyclohexane, on suppose retrouver des impuretés (acides gras, ...).

J'ai effectué la délipidation sur les extraits liposolubles de foies de murènes (FM MeOH) et d'anglais (FA MeOH), de la chair de poissons perroquets de la zone toxique (CZT MeOH) et non toxique (CZNT MeOH), ainsi que des bénitiers (ben MeOH).

Analyse de la toxicité

Test biologique de toxicité aiguë sur souris :

Le "test souris" est le test classique d'évaluation de la toxicité aiguë de nombreuses substances. Il fut appliqué aux ciguatoxines dans le but initial de les détecter au sein d'un extrait pisciaire. Il est maintenant devenu le test de référence pour la détection biologique des ciguatoxines au laboratoire.

L'extrait à injecter doit tout d'abord être préparé soigneusement. Un liquide physiologique (eau, NaCl 0,9%, Tween 60 0,1%) est donc préparé pour la dilution des extraits, à raison d'un volume de 0,1 à 0,4 mL par injection. La solution ou émulsion obtenue est homogénéisée par chauffage ou agitation sous Vortex™ et/ou ultra-sons avant administration.

Les souris (souris OF1) sont placées à environ 25°C, disposant d'eau et de nourriture. Au moment du test, le poids des souris utilisées doit être compris entre 18 et 22 g. Les souris, distinctement marquées pour identification, sont placées dans une cage sur une couche de papier propre. L'extrait est injecté à l'aide d'une seringue de 1 mL (e.g. seringue à insuline), assortie d'une fine et courte aiguille, dans le péritoine de l'animal, environ entre les deuxième et troisième tiers postérieurs de la face ventrale (injection intra péritonéale). L'heure d'injection, la masse d'extrait administrée, le poids et le sexe de l'animal sont notés. La souris est observée jusqu'à sa mort ou pendant au moins 48h, et ses signes, leur heure d'apparition et l'heure de

la mort sont consignés (Annexe 3). Il y a possibilité aussi de faire des prélèvements anapathologiques (dissection de la souris et prélèvement du cerveau, des poumons, du cœur, de la rate, du foie, et des reins) pour un suivi évolutif des organes primaires.

Les signes classiques de la ciguatera observés chez la souris sont (d'après Lewis, 1995) : train arrière pseudo paralysé, tremblements, diarrhée, prostration, dyspnée, lacrymation, hypersalivation, hypothermie (poils hérissés).

La toxicité est exprimée en unité souris (US, ou mouse unit, MU) définie comme étant la quantité d'extrait injectée par souris de 20g qui tue 50% d'un lot de souris injectés.

J'ai effectué ce test à partir des différents extraits colorés en bleu sur les tableaux de la page 20 et 21, étant donné que l'étude était déjà en cours lors de mon arrivée (de même pour la préparation des extraits). En effet, le test se déroule en plusieurs fois du fait du manque de matière biologique (prélèvement sur le terrain, préparation des extraits) ou de souris (attendre la reproduction).

L'analyse des résultats permet d'aboutir à quelques conclusions :

On observe une toxicité des *Gambierdiscus* sp assez élevée sur les 4 souris injectées. Les symptômes observés sont des symptômes classiquement provoqués par les ciguatoxines. La réponse de toxicité est proportionnelle à la dose injectée.

On observe une toxicité des cyanobactéries aussi bien dans la phase liposoluble, que dans la phase hydrosoluble. La toxicité de la phase hydrosoluble est très élevée et les symptômes sont caractéristiques d'une puissante neurotoxine (sauts, spasmes).

Les résultats montrent qu'on ne peut pas mettre en évidence une différence de toxicité, sur les souris, des poissons en fonction de la zone de pêche, que les foies semblent plus toxiques que les chairs et que la phase liposoluble paraît plus toxique que la phase hydrosoluble.

Les extraits de bénitiers montrent une forte toxicité sur les souris en particulier l'extrait hydrosoluble. Les symptômes observés, surtout les sauts et les spasmes, ressemblent aux symptômes observés lors de l'injection des extraits de cyanobactéries.

Quant aux exudats de cyanobactéries, ils sont toxiques et permettent de nous orienter vers l'hypothèse selon laquelle certaines cyanotoxines pourraient être transmises aux bénitiers. Les symptômes retrouvés sont proches des symptômes observés lors de l'injection des extraits de cyanobactéries.

Voici les résultats obtenus, indiqués dans les deux tableaux suivants en fonction de la polarité des extraits :

Extraits hydrosolubles

Organisme	Masse de départ (g)	Extrait (mg)	Injections (mg par g de souris)	Symptômes principaux	Temps de survie
Cyanobactéries (28 avril)		335	5	Saut, spasmes	2 min
			4		5 min
Bénitiers	850	727	5	Sauts, spasmes	2 min
			4		5 min
			2,5	Affaissement du train arrière	>72 h
			1		
Chairs de poissons (zone non toxique)	400	1282	13	Difficultés à se déplacer ; tremblement ; prostration	2 h
			5		>72 h
			15	-	11 mn
			10	Poils hérissés	Autopsiée 29 h
Chairs de poissons (zone toxique)	800	2816	13	Difficultés à se déplacer	>72 h
			5		
			15	Difficultés à se déplacer	Autopsiée 30 h
			10	Difficultés à se déplacer ; tremblements	> 48 h
Foies de poissons (zone non toxique)	11	85	5	Difficultés à se déplacer	>72 h
Foies de poissons (zone toxique)	28	688	12	Difficultés à se déplacer ; affaissement ; tremblements ; prostration	36 h
			3		>72 h
			15	Difficultés à se déplacer ; affaissement	Autopsiée 28 h
Foies d'anglais	274	1814	15	-	1 mn
			7,5	-	3 mn
			1,5	Prostration ; poils hérissés	Autopsiée 29 h
Exsudat L1, dessalage EtOH absolu		2579	10	-	1 mn
			2,5	Très réactive	Autopsiée 29 h
Exsudat L1, dessalage XAD ₄ MeOH		350	5	-	19 mn
			2	Spasmes ; pattes affaissées	Sacrifiée 22h
Exsudat L2, dessalage XAD ₄ MeOH		163	5	Très réactive ;	Autopsiée 29 h
Exsudat L2, dessalage XAD ₄ H ₂ O		5513	10	Sauts	5 mn
			5	Très réactive	> 48 h

Extraits liposolubles

Organisme	Masse de départ (g)	Extrait (mg)	Injections (mg par g de souris)	Symptômes principaux	Temps de survie
<i>Gambierdiscus</i> sp.	Estimation: 350 000 cellules	93	2	Train arrière pseudo paralysé ; tremblements ; inaction ; paralysie flasque des membres ; poils non hérissés	30 min
			0,4		8h
			0,3		9h
			0,26		9h45
Cyanobactéries (15 au 17 mars)		119	4	Train arrière pseudo paralysé ; tremblements ; poils hérissés ; vasodilatation de l'artère caudale ; transpiration ; prostration	12h
			2		>36 h
Cyanobactéries (28 avril)		142	3	Train arrière pseudo paralysé ; tremblements ; poils hérissés ; prostration	Entre 9h et 14h
Bénitiers	850	1590	6	Affaissement ; cambrement	5 h
			2,5	Affaissement ; prostration	>72 h
		319	2	Affaissement ; prostration	46 mn
			1,5	Affaissement ; prostration ; diarrhée ; yeux gonflés	2 h
Chairs de poissons (zone non toxique)	400	1670	9	Affaissement de l'arrière-train	>72 h
			5		
Chairs de poissons (zone toxique)	800	3120	9	Affaissement de l'arrière-train	>72 h
			5		
Foies de poissons (zone non toxique)	11	1420	9	Affaissement de l'arrière-train ; paralysie flasque	7h30
			5		>72 h
		72	2	Affaissement de l'arrière-train ; poils hérissés	Autopsiée 46 h
			1	Affaissement de l'arrière-train	> 48 h
Foies de poissons (zone toxique)	28	7290	5	Affaissement de l'arrière-train ; paralysie flasque	7h
			3		45 h
		138	3	Affaissement de l'arrière-train ; poils hérissés	Autopsiée 41 h
			2	Affaissement de l'arrière-train	Autopsiée 44 h
			1	Affaissement de l'arrière-train	> 48 h
Foies d'anglais	274	576	5	-	7 mn
			4	Spasmes, diarrhée	8 mn
			2,5	Affaissement de l'arrière-train ; poils hérissés ; tremblements ; spasmes	4 h 35
			1	Hyperactivité ; poils hérissés	> 48 h
Foie de murène (Amédé)	21,7	155	1,85	Affaissement de l'arrière-train ; diarrhée	< 16 h
			0,85	Affaissement de l'arrière-train ; diarrhée	Autopsiée 46 h

Discussion :

Les dinoflagellés (*Gambierdiscus* sp)

La mise en évidence de la toxicité de ces *Gambierdiscus* sp. montre qu'il est fort probable que les habitants d'Hunëtë aient subi des intoxications de type ciguatérique suite à l'ingestion de poissons pêchés dans la zone d'étude. Cependant la sévérité de certains cas laisse suggérer l'existence d'une source supplémentaire d'intoxication qui serait provoquée par d'autres neurotoxines.

Les cyanobactéries

Les résultats concernant les prélèvements de cyanobactéries montrent que leur présence est caractéristique de la zone réputée toxique. Les cyanobactéries prélevées du 15 au 17 mars 2005 ainsi que celles prélevées le 28 avril se sont révélées encore plus toxiques chez les souris que les prélèvements de *Gambierdiscus* sp. La toxicité de la phase liposoluble reste cependant comparable, par rapport aux symptômes et aux temps de survie, à celle des *Gambierdiscus* sp.. La phase hydrosoluble des cyanobactéries est quant à elle beaucoup plus toxique chez les souris et provoque des symptômes très différents (sauts, spasmes) de ceux provoqués par l'injection des phases liposolubles. Le test comparant la phase hydrosoluble des *Gambierdiscus* sp. n'a pu être réalisé, car trop peu de matière biologique a été extraite pour pouvoir l'injecter sur des souris. La toxicité de la phase liposoluble des cyanobactéries chez les souris ressemblant à celle des *Gambierdiscus* sp., il paraît donc envisageable que certaines cyanobactéries puissent être à l'origine de symptômes similaires aux symptômes ciguatériques chez l'homme. Cependant, se pose entre autres, la question du mode de transmission de la toxine le long de la chaîne alimentaire. Les cyanobactéries ne sont, à priori, pas directement consommées par les poissons herbivores mais on peut envisager une contamination lorsqu'ils broutent le gazon d'algues environnant. L'observation du gazon au microscope a en effet révélé la présence d'un grand nombre de cyanobactéries. Il serait intéressant de tester la toxicité de l'extrait de cyanobactéries sur des poissons pour déterminer s'ils peuvent constituer un vecteur de transmission de la toxine pour l'homme.

Les symptômes très différents provoqués par l'injection de la phase hydrosoluble semblent indiquer qu'il y aurait plusieurs toxines différentes dans ces cyanobactéries, phénomène confirmé par les données bibliographiques (Endean *et al.*, 1993). Les tests de toxicité chez les souris (symptômes et caractéristiques de la toxine) montrent qu'il s'agit probablement d'une neurotoxine comme la saxitoxine. Un échantillon de l'extrait a été donné à analyser pour identification de la toxine. La présence de ce type de neurotoxine est connue chez les cyanobactéries mais encore une fois, une transmission éventuelle de la toxine à partir de cyanobactéries benthiques du genre *Hydrocoleum* le long de la chaîne alimentaire n'est pas connue.

Les extraits de poissons

En ce qui concerne la toxicité des extraits de poissons pêchés à Lifou, les résultats montrent que leur toxicité sur les souris, bien que plus faible, ressemble, au niveau des symptômes, à celle des *Gambierdiscus* sp. et qu'il n'y a pas de différence dans leur toxicité chez les souris en fonction du lieu de pêche. L'absence de relation entre la toxicité des poissons et le lieu de pêche paraît logique compte tenu de la mobilité des poissons perroquets. Il était somme toute important de tester des poissons sur

l'ensemble de la zone d'étude pour comprendre le phénomène d'intoxication massive des adultes de Hunëtë.

Les symptômes observés avec les injections d'extrait de poissons chez les souris sont compatibles avec des symptômes classiques de ciguatera. Par contre les résultats chez les souris ne semblent pas confirmer l'hypothèse d'une éventuelle transmission de cyanotoxines aux poissons. Cependant, les résultats des injections des extraits de poissons sont cependant difficiles à interpréter car trop peu de souris ont été testées et pas assez de poissons ont été prélevés.

La sévérité de certains cas observés chez l'homme peut être expliquée en partie par la forte variation de la sensibilité individuelle aux ciguatoxines et par une éventuelle contamination des poissons par des cyanotoxines qui n'aurait pas été mise en évidence par notre analyse de toxicité. Cependant il est très probable, que les habitants de Hunëtë aient subi un épisode de ciguatera avec une transmission classique des ciguatoxines présentes dans les microalgues via la chaîne alimentaire pisciaire.

Au niveau des extraits de foies d'Anglais et de Murènes, les résultats montrent qu'ils sont toxiques, notamment plus toxiques que les extraits de poissons pêchés à Lifou, Par contre, leur toxicité est plus faible que celle des *Gambierdiscus* sp., Cette dernière comparaison ne se fait qu'entre les extraits liposolubles.

Les symptômes observés avec les injections d'extrait de poissons chez les souris sont compatibles avec des symptômes classiques de la ciguatera et confortent notre hypothèse comme étant des témoins positifs (présence de maïtotoxines au niveau des extraits hydrosolubles, et de ciguatoxines au niveau des extraits liposolubles).

La différence de toxicité entre les différents extraits de poissons (Lifou, Récifs de Chesterfields) au niveau du temps de survie de la souris peut être interprétée par la quantité de toxine ingérée ainsi que leur bioaccumulation durant la vie du poisson.

Les extraits de bénitiers

Pour la toxicité des extraits de bénitiers, les résultats montrent que celle-ci est similaire à celle des cyanobactéries, aussi bien au niveau des temps de survie que des symptômes. Leur toxicité est, également, plus élevée que celle des poissons.

On sait que les bénitiers *Tridacna* sp. sont des organismes sessiles filtreurs et que les cyanobactéries peuvent relarguer dans la colonne d'eau un exsudat, appelé « eau rouge » en quantité assez importante (Endean *et al.*, 1993). Cet exsudat est la plupart du temps dilué dans la colonne d'eau mais du fait de la configuration particulière de la zone dégradée (faible hauteur de la colonne d'eau, zone enclavée) et de la capacité de filtration très importante des bénitiers, on peut envisager que la toxicité observée avec les bénitiers aurait pour origine la présence des cyanobactéries et que la transmission des toxines se serait faite par filtration de l'exsudat.

Les exudats de cyanobactéries

Notre hypothèse serait confortée par la toxicité engendrée sur souris des exudats de cyanobactéries. Cependant, on observe une toxicité un peu plus faible par rapport à celle observée à partir de nos extraits de bénitiers et de nos cyanobactéries ainsi qu'une forte toxicité pour l'extrait hydrosoluble XAD4 H₂O de l'exudat L2, celle-ci mettant en doute notre extraction à la colonne XAD4. Notre dessalage au XAD4 à

partir de notre exudat L2 est donc à refaire, nous donnant les extraits L2 XAD4 MeOH' et L2 XAD4 H2O' ; et les substances présentes dans cet extrait sont à mettre en évidence pour connaître la « source » de cette toxicité (cf CCM).

Il est évident que notre protocole d'analyse de la toxicité de la zone d'étude est incomplet, tant pour le nombre et la nature des prélèvements que pour le nombre des injections et des souris testées. Cependant, notre analyse nous a permis de révéler et de s'orienter vers deux sources d'intoxication potentielles pour l'homme (Figure 5) avec probablement deux voies différentes d'accumulation de toxine (différentes car non mis en évidence d'un passage de cyanotoxines aux poissons par ce test) le long de la chaîne alimentaire :

- Les cas d'intoxications élevés chez l'homme lors de l'ingestion de bénitiers contenant des toxines hydrosolubles (cyanotoxines hydrosolubles, qui ont une forte toxicité).

Les bénitiers ne seraient-ils pas capables de filtrer des toxines liposolubles de cyanobactéries (ciguatoxines like) (dans ce cas là, il faut prendre en compte que l'exudat de cyanobactéries contient des toxines hydrosolubles, et/ou également des toxines liposolubles)?

Y aurait-il une accumulation de toxines hydrosolubles et liposolubles expliquant les cas de fortes intoxications ?

- Les cas d'intoxications élevés chez l'homme lors de l'ingestion de poissons contenant des toxines liposolubles de *Gambierdiscus* sp. (épisode ciguatérique classique). La toxicité élevée des poissons seraient alors expliquée par la forte variation de la sensibilité individuelle aux ciguatoxines.

N'y aurait-il pas une contamination des poissons par des cyanotoxines voire par une accumulation des ciguatoxines et cyanotoxines, expliquant également les cas de forte intoxication ?

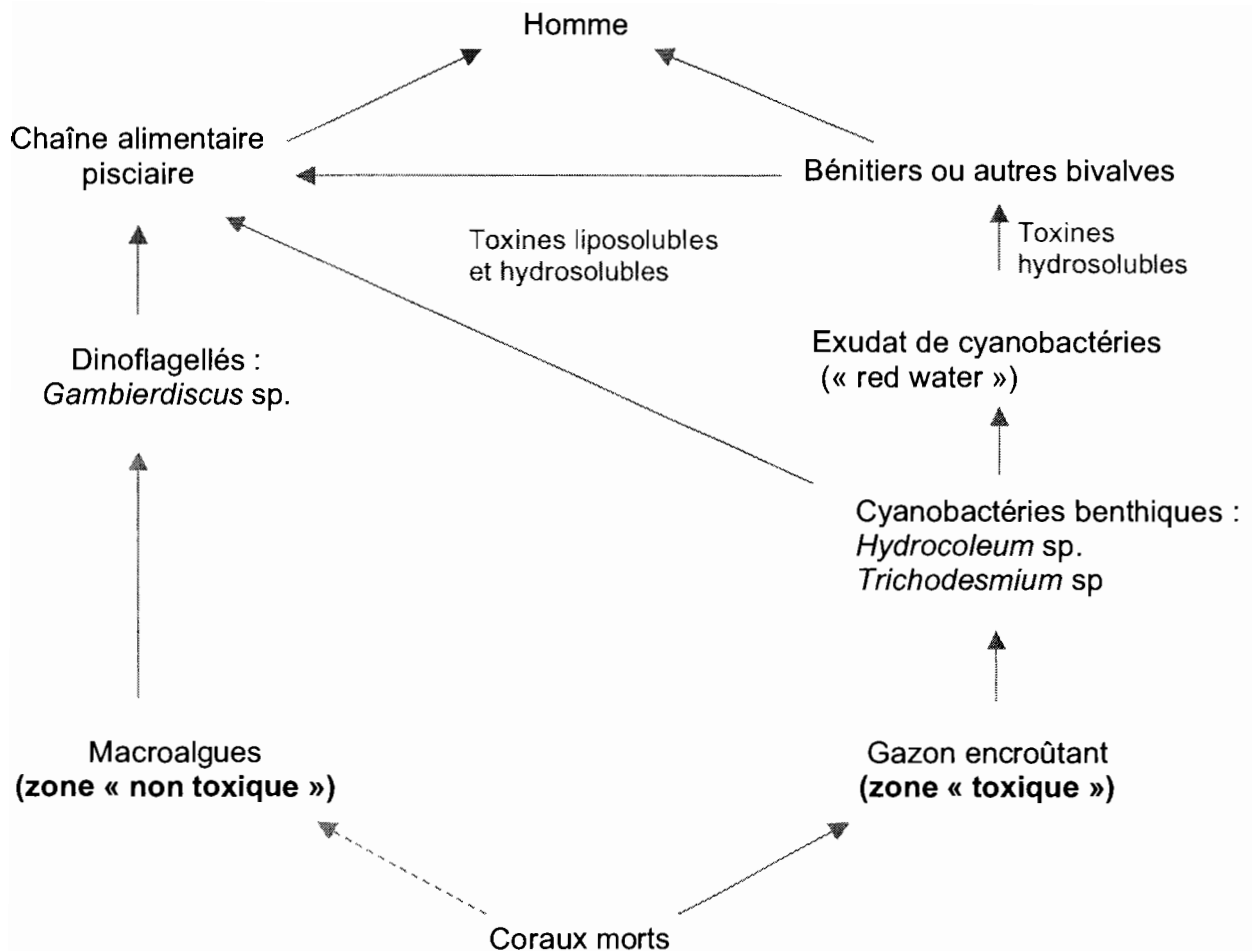


Fig. 5 : Les deux voies potentielles d'intoxication à Hunetë

Chromatographie sur Couche Mince comparative :

Cette étude nous permet de mettre en évidence les différentes substances présentes dans nos extraits et de pouvoir, par la suite, les comparer entre elles.

Le principe de la chromatographie sur couche mince consiste à déposer quelques gouttes de nos différents extraits sur une plaque de silice (plusieurs plaques de silice sont bien sûr utilisées) et de faire migrer nos extraits par l'intermédiaire d'un solvant. Cette migration permet de séparer nos substances présentes dans nos extraits (substances qui ne sont pas forcément toxiques) en fonction de leur polarité.

Le protocole suivi, d'après Endean *et al.* (1992), nous a orienté pour le choix de nos éluants et de nos révélateurs :

Pour nos extraits hydrosolubles, on utilise deux éluants :

- un mélange binaire de dichlorométhane/méthanol ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$) en proportion 90/10 (polarité +)
- un mélange ternaire de n-butanol/eau/éthanol (n-butanol/ $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$) en proportion 4/2/1 (polarité +++)

Pour nos extraits liposolubles, on utilise comme éluant le mélange binaire chloroforme/méthanol en proportion 80/20.

On utilise trois révélateurs :
 - l'ultraviolet
 - l'association vanilline/acide sulfurique/chauffage qui nous permet de mettre en évidence de façon non spécifique les substances présentes dans nos extraits (et ainsi toutes les toxines recherchées)
 - le dragendorff qui permet de mettre en évidence spécifiquement les alcaloïdes.

Ce dernier révélateur nous permet de séparer les cyanotoxines alcaloïdiques (saxitoxine, anatoxine) avec les toxines de *Gambierdiscus* sp. et les cyanotoxines peptidiques dans le but de vérifier l'hypothèse suivante : la toxicité observée avec les bénitiers aurait pour origine la présence des cyanobactéries et la transmission des toxines se serait faite par filtration de l'exsudat, mais aussi de vérifier une éventuelle contamination de nos poissons par les cyanotoxines alcaloïdiques.

Je rappelle que les ciguatoxines sont des polyéthers polycycliques et les toxines à PSP ont une structure alcaloïdique (porteuses de groupement amine) (Figure 6).

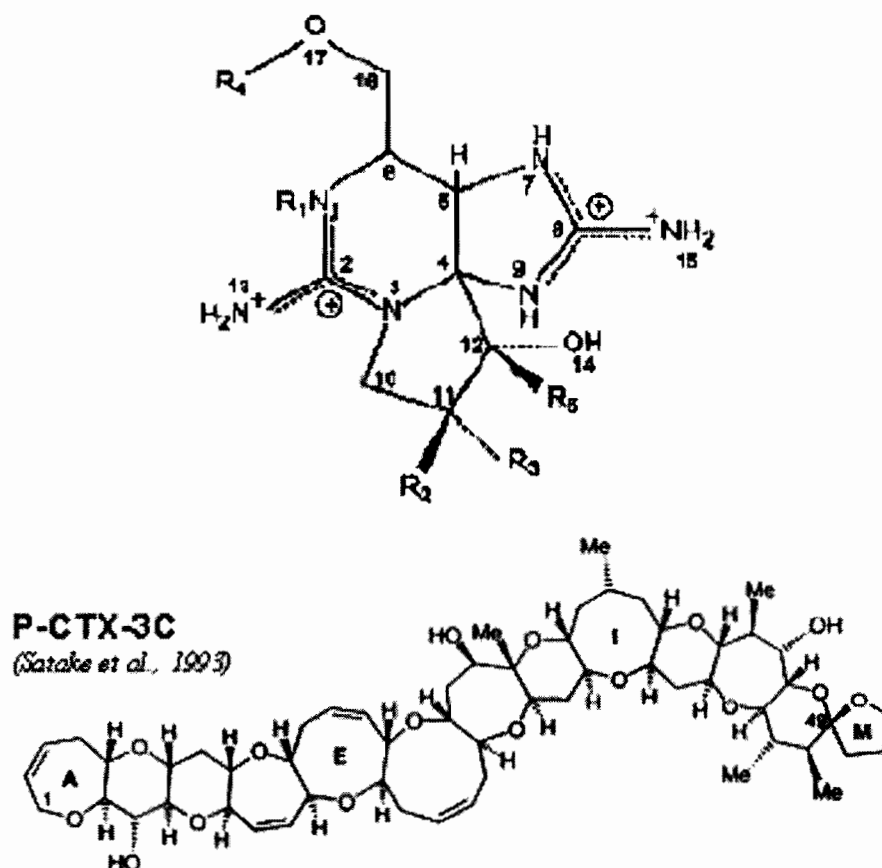
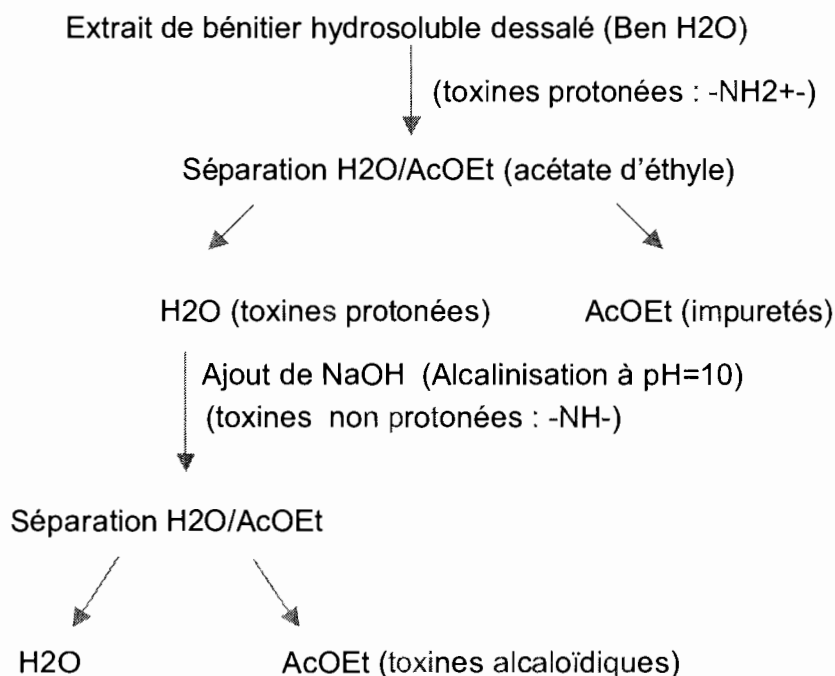


Fig. 6 : Structure chimique de la saxitoxine (toxine à PSP) et de la P-CTX-3C

Le choix de nos extraits pour réaliser ce test s'est fait en fonction de la quantité restante de nos extraits et du test de cytotoxicité aiguë sur souris.

Suivant notre hypothèse, une extraction spécifique de toxines alcaloïdiques (portant un groupement amine) est effectuée suivant le protocole suivant :



A noter qu'une très faible quantité de matière biologique a été extraite par l'acétate d'éthyle (AcOEt), que ce soit pour la première séparation que pour la deuxième.

Voici les résultats obtenus de nos différentes chromatographies sur couche mince (CCM) :

Extraits hydrosolubles

Au départ, du fait du grand nombre d'extraits à déposer, on a fait une séparation entre les extraits L1 XAD4 MeOH, L1 XAD4 H2O, L2 XAD4 MeOH, L2 XAD4 H2O repris au MeOH, , L2 XAD4 H2O repris à l'eau, , L2 XAD4 H2O repris à l'éthanol absolu, L2 XAD4 MeOH', L2 XAD4 H2O' (première plaque) et les extraits L1 EtOH, L2 EtOH, Benitiers (Ben), cyanobactéries (Cyano), chair de poissons de la zone non toxique (CNT), chair de poissons de la zone toxique (CT), foies d'anglais (FA) (deuxième plaque).

Quatre spots ont été mis en évidence sur notre première plaque (L1 EtOH, L2 EtOH, Ben H2O, Cyano H2O) et deux spots sur notre deuxième plaque (L2 XAD4 MeOH, L2 XAD4 MeOH'), en utilisant le révélateur vanilline/H2SO4/chauffage.

On compare donc ces extraits en les rassemblant pour voir si on observe des similarités entre les substances (avec le même éluant) (Figure 7) :

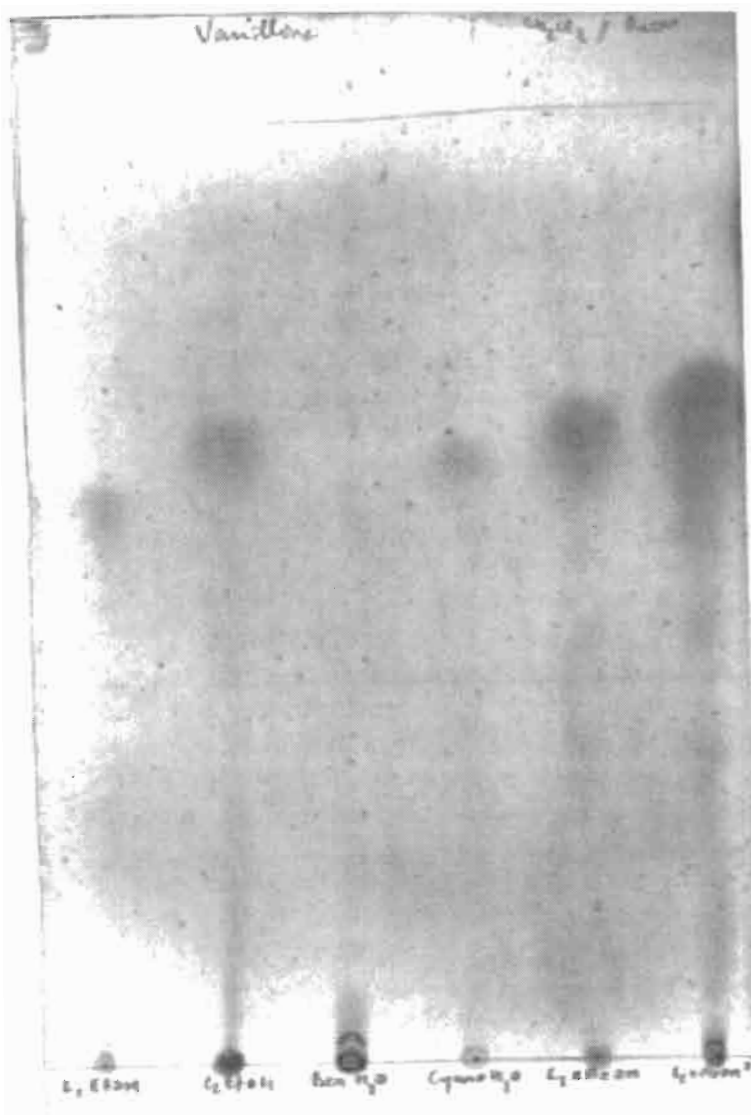


Fig. 7 : CCM comparative d'extraits hydrosolubles (éluant CH₂CL₂/MeOH, vanilline)

D'après cette CCM (Figure 7), on a mis en évidence des substances dans chacun des extraits (excepté pour le Ben H₂O). Quelle est leur caractéristique physicochimique ? Et sont elles toxiques ? Etant donné la similarité du niveau de migration, aurions nous mis en évidence une substance commune à chacun de ces extraits ?

Sur notre première plaque (éluant CH₂CL₂/MeOH, vanilline), on observe une faible migration au niveau des extraits CT et CNT alors que sur celle utilisant le mélange ternaire comme éluant, on observe une forte migration au niveau des extraits Ben H₂O, CNT et CT.

On compare donc ces trois substances entre elles (Ben H₂O, CNT et CT). On a recours à un changement d'éluant de polarité intermédiaire : CH₂CL₂/EtOH/H₂O en proportion 68/30/2 (polarité ++), et on utilise les deux révélateurs.

Il est difficile de conclure sur une éventuelle similarité entre les spots présents, mais tout du moins la présence d'alkaloïdes se confirment une nouvelle fois dans nos extraits de chairs de poissons de la zone toxique et de la zone non toxique.

Avec les CCM révélées au Draggendorf, on n'a pas de mise en évidence d'alkaloïdes exceptés pour la deuxième plaque (éluant ternaire) où l'on observe la présence d'alkaloïdes dans nos extraits CNT H₂O et CT H₂O. Ce qui n'est pas en corrélation avec notre test de cytotoxicité aiguë sur souris.

D'autre part, par rapport à notre extraction spécifique d'alkaloïdes (extraction en double cascade à l'acétate d'éthyle) à partir de notre extrait de bénitier hydrosoluble dessalé, on effectue également une CCM comparative (éluant CH₂CL₂/MeOH 90/10, Vanilline et Draggendorf). On dépose donc comme extraits : l'extrait à l'acétate d'éthyle de notre première cascade (Ben AcOEt (1)), l'extrait à l'acétate d'éthyle de notre deuxième cascade (Ben AcOEt (2)), l'extrait aqueux de notre deuxième cascade (Ben H₂O) et l'extrait liposoluble de bénitier délipidé (Ben MeOH).

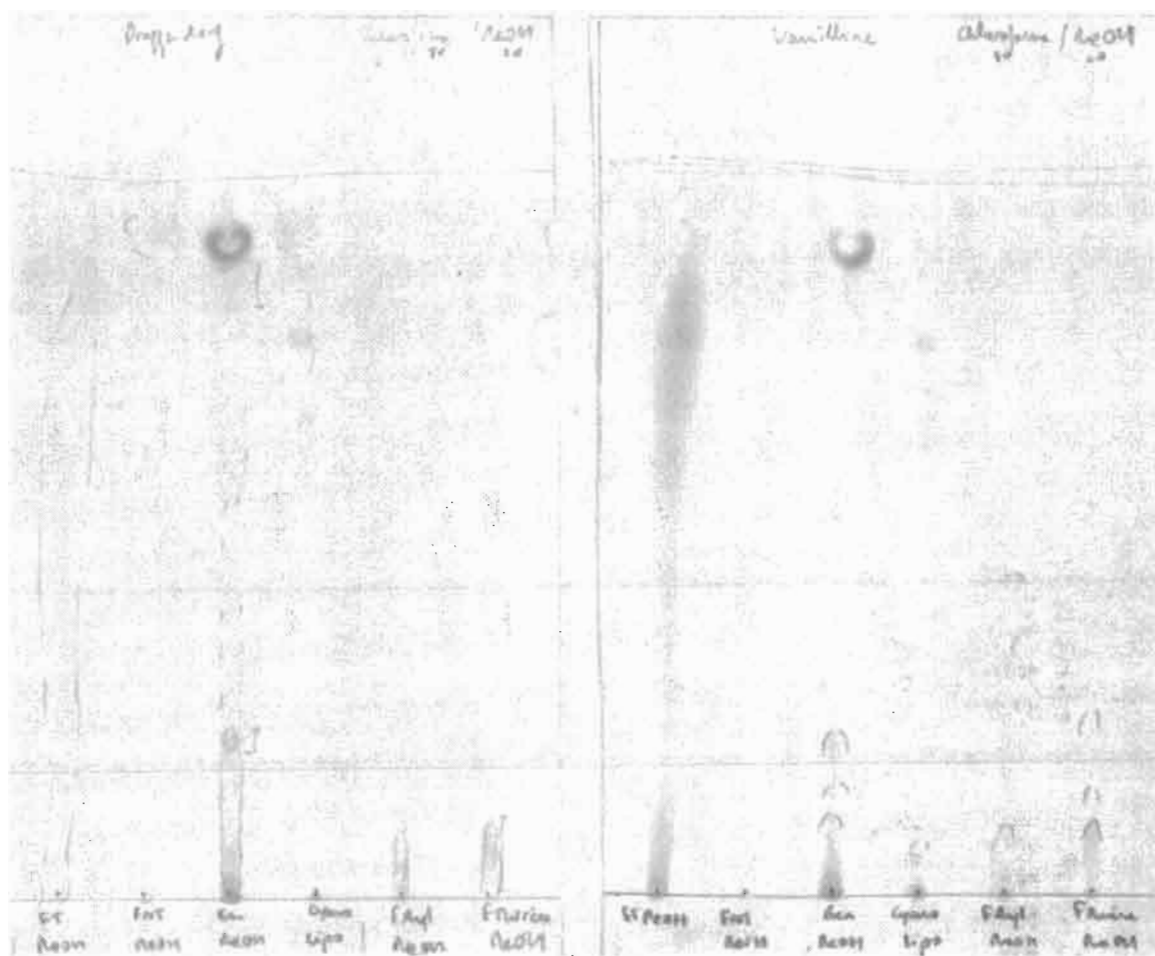
D'après la CCM comparative, il n'y a pas d'alkaloïdes dans nos extraits hydrosolubles de bénitiers (que ce soit dans notre extrait Ben AcOEt (1), ou celui et surtout notre extrait Ben AcOEt(2)), ce qui remet en cause notre extraction spécifique d'alkaloïdes (ce mode d'extraction n'est pas adaptée à nos extraits, confirmant le peu de masse de matière biologique retrouvée lors de celle-ci) mais aussi notre hypothèse de départ : la toxicité observée avec les bénitiers aurait pour origine la présence des cyanobactéries et la transmission des toxines se serait faite par filtration de l'exudat.

Pour conclure, notre hypothèse n'est pas vérifiée du fait qu'il y a une mise en évidence d'alkaloïdes dans notre extrait liposoluble. Il y a donc remise en cause de notre extraction initiale de bénitiers séparant les substances hydrosolubles des substances liposolubles (les neurotoxines alcaloïdiques des cyanobactéries comportent un groupement NH₂⁺ et sont hydrosolubles).

Extraits liposolubles

Toujours en fonction de la quantité restante de nos extraits et du test de cytotoxicité aiguë sur souris, on choisit de déposer quelques gouttes des extraits suivants : Foie de poissons de la zone toxique (FT MeOH), foie de poissons de la zone non toxique (FNT MeOH), bénitiers liposolubles (Ben MeOH), cyanobactéries liposolubles, foie d'anglais (FA) et foie de murènes (FM) (Figure 8).

Fig. 8 : CCM d'extraits ^{lipos} hydrosolubles (éluant chloroforme/MeOH, Draggendorf (à droite), Vanilline (à gauche))



Au draggendorf, on observe la présence d'alkaloïdes au niveau des extraits de FT, FNT, Ben MeOH et Cyano lipo avec une forte migration. On compare alors ces substances mais cette fois-ci en utilisant un éluant moins polaire : chloroforme/MeOH en proportion 90/10 (Figure 9).

A la vanilline/H₂SO₄/chauffage, on observe une faible migration au niveau de quatre extraits : Ben MeOH, Cyano lipo, FA MeOH et FM MeOH. On compare alors ces substances en utilisant un éluant plus polaire pour avoir une meilleure migration de celles-ci : le mélange ternaire CH₂Cl₂/EtOH/H₂O en proportion 68/30/2 (Figure 10).

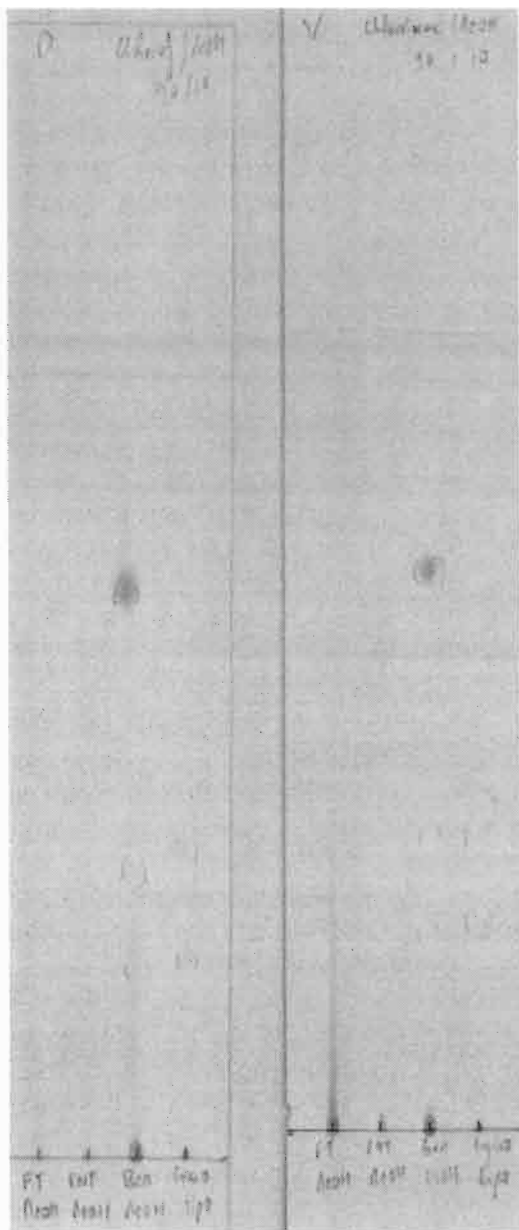


Fig.9 : CCM comparative d'extraits liposolubles (éluant chloroforme/MeOH, Dragendorff (à gauche), Vanilline (à droite))

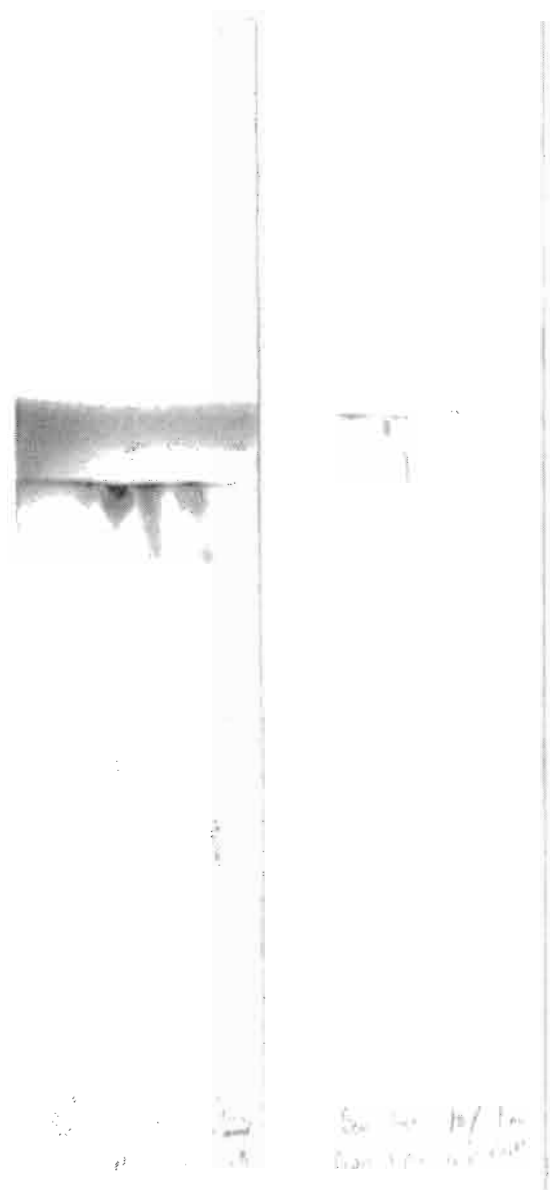


Fig.10 : CCM comparative d'extraits liposolubles (éluant $\text{CH}_2\text{CL}_2/\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$, Dragendorff (à droite), Vanilline (à gauche))

D'après les quatre CCM comparatives (Figure 9 et 10), on ne peut pas dire de façon explicite que l'on a mis en évidence des substances similaires dans chacun de nos extraits. Toutefois, on retrouve encore un spot dans notre extrait Ben MeOH liposoluble sur notre plaque de silice révélée au draggendorf (donc une substance alcaloïdique) et en utilisant le mélange chloroforme/MeOH comme éluant (Figure 9).

Discussion :

Différentes substances ont été mises en évidence dans nos extraits : on retrouve des alcaloïdes dans nos extraits CT et CNT hydrosolubles ainsi que dans notre extrait liposoluble de bénitier. Mais nos résultats tirés de nos chromatographies sur couche mince ne sont pas très concordants avec ceux tirés de nos tests de cytotoxicité aiguë sur souris. Ces différentes CCM ne confortent donc pas nos hypothèses (mise en évidence d'alcaloïdes au niveau de nos exudats, de nos extraits de bénitiers hydrosolubles (extraction spécifique) et de cyanobactéries hydrosolubles ; mise en évidence par la vanilline/H₂SO₄/chauffage d'une substance similaire dans les extraits de poissons de Lifou et ceux des poissons témoins).

Ceci dit, il est très difficile de mettre en évidence les toxines présentes dans nos extraits du fait de leur faible teneur. Et, je rappelle également qu'une faible teneur en toxine dans nos extraits peut induire une très forte toxicité. De plus, ces chromatographies, associées au test de cytotoxicité aiguë sur souris, nous permet de sélectionner nos extraits pour notre prochain test, le test de cytotoxicité cellulaire.

Le test de cytotoxicité cellulaire :

Ce test permet d'évaluer les effets cytotoxiques causés par une substance sur une lignée cellulaire en culture. Cette technique est intéressante en ce qu'elle permet l'analyse d'un grand nombre d'échantillons (i.e. automatisation possible) et qu'elle apparaît comme une bonne alternative aux tests sur animaux vivants.

On réalise ce test à partir d'une lignée de neuroblastomes de souris (Neuro-2A), qui est utilisée spécifiquement pour la détection de toxines bloquant les canaux sodiques.

Ce test est spécifiquement basé sur l'interaction qu'exercent les ciguatoxines avec leur protéine-cible, le canal sodium sensible au potentiel (CSSP). Il nous permet donc de doser les effets des CTXs sur la viabilité de différentes lignées de Neuro-2A. Et il s'est élargi à la détection des toxines, inhibitrices ou activatrices, du CSSP (Manger *et al.*, 1993).

Les modes d'action des toxines recherchées sont les suivants :

- les ciguatoxines (CTXs) sont des toxines spécifiques du site 5 de la sous unité α du canal sodique sensible au potentiel (CSSP). Les CTXs sont des composés activateurs des canaux sodiques neuronaux et provoquent une inhibition de l'inactivation du canal sodique. Il en résulte un flux entrant continu des ions sodium (Na⁺) à des potentiels de membrane plus négatifs (Poli *et al.*, 1986, Lombet *et al.*, 1997).

Ainsi, lors des potentiels de membrane, un courant de Na⁺ permanent est observé. Il en résulte une activation permanente, jusqu'à épuisement des neurotransmetteurs de la synapse. Au final, la stimulation nerveuse n'est plus effective par absence de neurotransmetteurs.

- les cyanotoxines hydrosolubles (anatoxine, saxitoxine) sont des toxines inhibitrices du CSSP. En effet, l'anatoxine surexcite les cellules musculaires en dégradant le fonctionnement d'un neurotransmetteur, l'acétylcholine, alors que la saxitoxine

bloque la propagation du signal électrique en empêchant les ions sodiums de traverser les membranes cellulaires (nerveuses, musculaires et cardiaques).

La cytotoxicité peut être appréciée soit au moyen des modifications morphologiques subies par les cellules (Kogure *et al.*, 1988), soit par une réaction colorimétrique au moyen de la viabilité résiduelle révélée par le 3- [4,5 diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (sel de tétrazolium ou MTT) (Manger *et al.*, 1993).

Le test de cytotoxicité, lorsqu'il est pratiqué sur neuroblastomes (Neuro2A), utilise l'action combinée de la vératridine et de l'ouabaïne qui agissent comme des potentialisateurs des effets des toxines activatrices du canal sodique telles que les brévétotoxines (PbTXs) et les CTXs. En effet, la vératridine, composé alcaloïde liposoluble spécifique du site 2 des canaux sodiques, permet la stimulation des dits canaux et favorise la dépolarisation des membranes nerveuses. L'ouabaïne, quant à elle, appartient à la famille des glycosides cardiaques reconnus pour leurs activités cardiotoniques. Cette molécule agit en bloquant le transport actif des ions sodiques par inhibition de la pompe Na⁺/K⁺ ATPase. L'action combinée de la vératridine et de l'ouabaïne entraîne ainsi une augmentation de la concentration intracellulaire en ions sodium, ce qui induit une diminution de la viabilité cellulaire (Kogure *et al.*, 1988). De ce fait, en présence de vératridine et d'ouabaïne, les toxines bloquant le canal sodique ont pour effet d'augmenter la survie des cellules de façon dose-dépendante alors qu'à l'inverse, les toxines activatrices vont agir en augmentant la mortalité cellulaire (Manger *et al.*, 1993).

Cultures cellulaires :

Des aliquots de cellules Neuro-2A sont stockés en cryotube NUNC dans un container à azote liquide. La décongélation des cellules se fait rapidement dans un bain-marie à 37°C. Le contenu des cryotubes est inoculé dans un flacon de culture sous hotte à flux d'air laminaire en condition stérile, une fois la décongélation faite. Les cellules sont alors maintenues dans du RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) mélangé à du carbonate de sodium (26,7 mL de NaHCO₃ pour 1L de préparation du milieu RPMI) et enrichi avec 10 % de sérum de veau foetal, et 1 mL/100 mL d'une solution antibiotique (5 000 U/mL de pénicilline, 5 mg/mL de streptomycine). Ce milieu de culture liquide (RPMI complet) est renouvelé tous les 3 à 4 jours. Les cellules sont incubées dans une étuve à CO₂ maintenue en atmosphère humide enrichie en 5% de CO₂, à une température de 37°C.

Les Neuro-2A sont des cellules adhérentes à leur substrat. Une fois en phase stationnaire de croissance, une étape de trypsinisation est nécessaire avant 1) repiquage dans un nouveau flacon de culture, ou 2) numération cellulaire en vue de leur cryoconservation sous azote liquide ou de leur ensemencement en microplaques.

Cette trypsinisation consiste en l'action enzymatique de la trypsine qui détache les cellules de leur support, avec une activité optimale à 37°C. Cette action est couplée à celle de l'Acide Ethylène Diamine TetraAcétique (EDTA) permettant la protéolyse des jonctions intercellulaires. L'ajout de milieu de culture liquide arrête la double action enzymatique. Il en résulte alors une mise en suspension de cellules rondes, individualisées.

En pratique, pour effectuer cette trypsinisation, les cellules en culture doivent être à

confluence et former un tapis cellulaire monocouche. Elles sont alors soumises à l'action successive PBS (1X) et de trypsine- Acide Ethylène Diamine TetraAcétique. Le nettoyage des cellules au PBS (1X) sans magnésium ni calcium a pour but d'affaiblir les jonctions cellulaires, afin de potentialiser les effets des deux enzymes. Les cellules sont incubées en présence de ce mélange enzymatique pendant 5 à 10 minutes à 37°C. Après homogénéisation, les cellules sont repiquées au 5^{ème} (1mL dans 5 mL de milieu de culture) pour les petites flasques de culture d'origine, ou au 15^{ème} pour les grandes flasques de culture d'origine, ce qui permet de mettre fin à l'activité enzymatique, tandis que 100 µL de suspension cellulaire sont prélevés à fin de numération.

Le protocole de la numération est le suivant : 100 µL de cette dilution sont colorés avec 100µL de bleu-trypan (0,2%). Après 5 minutes d'incubation, les cellules vivantes et les cellules mortes (qui apparaissent colorées par le bleu trypan) sont dénombrées sur lame de numération (cellule de KOVA) au microscope optique. Le nombre de cellules totales (N) est donné par la formule suivante :

$$N = C \cdot d \cdot 1000 \cdot V \text{ où}$$

C : nombre de cellules comptées dans un volume de 1 mm³;

d : facteur de dilution (il est de 2);

V : le volume total de la suspension (en mL).

Le taux de viabilité est obtenu par la formule suivante:

Tv = nombre de cellules vivantes/nombre de cellules totales. Le taux de viabilité minimum requis pour une cryoconservation ou un ensemencement ultérieur en micro-plaques doit être de 90%.

La cryoconservation des cellules s'effectue selon le protocole suivant : après une légère centrifugation (5 min à 2000 tours/min), le culot cellulaire est repris dans 0,4/1 mL de milieu RPMI complet enrichi avec 0,5/1 mL de sérum de veau fœtal, et 0,1/1 mL de Diméthyle Sulfoxyde (DMSO). Ce dernier permet de conserver intactes les membranes cellulaires lors de la congélation, alors qu'à température ambiante il serait néfaste pour ces membranes. Les cellules sont alors réparties dans des cryotubes NUNC, puis placés dans un congélateur. Après 24h, les cellules Neuro-2A contenues dans les cryotubes NUNC sont transférées en bonbonne d'azote liquide à -196°C.

Densité cellulaire :

Le test de cytotoxicité se déroule généralement sur 48h : il faut en effet 24h pour l'obtention d'un tapis cellulaire sub-confluent suivi d'une incubation des cellules en présence des toxines pures ou des extraits toxiques pendant encore 24h. Les cellules ne doivent pas être trop confluentes au risque de provoquer un décollement du tapis cellulaire qui ne serait pas dû à l'action des toxines elles-mêmes mais à cause d'une densité cellulaire trop importante.

Mesure de l'absorbance :

Dans les différentes publications traitant des tests de cytotoxicité qui utilisent le MTT à l'étape de révélation, la longueur d'onde à laquelle l'absorbance est mesurée est variable, selon les auteurs : 492 nm selon Dechraoui *et al.* (1999), 544 nm selon Bottein-Dechraoui *et al.* (2005) ou 570 nm selon Fairey *et al.* (2001). Dans le cas de

notre étude, l'absorbance des cellules Neuro-2A sera mesurée à deux longueurs d'onde différentes, 492 et 570 nm, dans un lecteur de microplaques.

Révélation au moyen du MTT et du DMSO :

Après 24h d'incubation, le milieu de culture présent dans chaque cupule est remplacé par 50 μ L d'une solution de sel de tétrazolium MTT à 0,8 mg/mL.

Initialement de couleur jaune pâle, ce sel est métabolisé par les cellules vivantes sous la forme de cristaux de formazan de couleur bleu. L'ajout de 100 μ L de DMSO permet la lyse des cellules et la solubilisation des cristaux colorés, à l'obscurité. Un lecteur de microplaque automatique est alors utilisé pour déterminer l'absorbance de chaque puits à 492 nm et 570 nm. La coloration produite est ainsi directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes par cupule.

Schéma d'ensemencement des microplaques :

Avant calibration du test de cytotoxicité, plusieurs conditions doivent être vérifiées préalablement.

Le premier consiste à déterminer une gamme de concentration cellulaire capable de métaboliser correctement le MTT en formazan de façon à effectuer le test de manière répétitive.

Des contrôles sont effectués en présence de vératridine seule (à 10, 50 et 100 μ M), et/ou d'ouabaïne seule (à 50 μ M), avec ou sans adjonction de PbTx ou de CTXs, pour vérifier leur non-toxicité sur les cellules Neuro-2A à ces concentrations. De même, l'action des CTXs ou des PbTx seuls, sans adjonction de vératridine et d'ouabaïne, est également évaluée.

Enfin, les extraits toxiques secs étant repris dans du méthanol absolu, un contrôle est effectué avec ce solvant seul afin de vérifier sa non cytotoxicité sur les cellules Neuro-2A.

La calibration du test à proprement parler s'effectue à l'aide de toxines pures, à savoir la PbTx-1, la PbTx-3, la P-CTX-1B et la P-CTX-3C, en présence de différentes concentrations de vératridine (10, 50 et 100 μ M). Pour ce faire, une gamme de concentrations de chaque toxine est testée. En pratique, une solution-mère de chaque toxine à 1.10^{-5} M dans du méthanol absolu est préalablement préparée, puis soumise à une série de dilutions successives dans du milieu de culture afin d'obtenir les concentrations de travail désirées.

Une fois le test calibré, il est appliqué à la détection des CTXs et des toxines à PSP éventuellement présentes dans plusieurs types de nos échantillons biologiques.

Ainsi, pour un test de cytotoxicité, chaque micro-plaque de 96 puits s'organise comme suit : les bords externes (36 puits) sont remplis avec 200 μ L d'eau distillée stérile afin d'éviter les phénomènes d'évaporation et les effets de bords. Les 60 puits restants sont ensemencés avec une suspension cellulaire de Neuro-2A à raison de 100 μ L par cupule. Après 24h d'incubation à 37°C, un examen minutieux de la confluence des cellules est effectué sur chacun des 60 puits.

Le bord extérieur de la micro-plaque (soit 28 puits) ensemencé avec des cellules n'ayant subi l'action d'aucune toxine, va fournir les puits-témoins. Aux 32 puits restants (soit 4x8 puits) sont rajoutés 20 μ L de vératridine à la concentration désirée. Le dernier lot de 8 puits fournira les témoins à l'action de la vératridine seule. Dans les 3 premiers lots de 8 puits chacun, trois concentrations différentes de l'extrait

toxique à analyser sont testées (qu'il s'agisse de toxines pures ou des échantillons biologiques de toxicité inconnue), à raison de 20 µL d'extrait toxique par cupule.

Expression des résultats :

L'absorbance est fonction de la quantité de cellules vivantes dans le puit, donc plus cette absorbance est élevée plus il y a de cellules vivantes. Le taux de mortalité (ou taux de cytotoxicité) est calculée à partir de l'absorbance maximum affichée par les cellules témoins (i.e. cellules non traitées, ensemencées et révélées en mêmes temps que les cellules traitées), en utilisant la formule suivante:

$$Tx \text{ Cytotoxicité} = (A_T - A_{Tox} / A_T) \times 100$$

où A_T : absorbance moyenne des cellules témoins et A_{tox} = absorbance moyenne des cellules en présence de l'extrait toxique.

Les résultats sont exprimés en taux de survie. $Tx \text{ Survie} = 100 - Tx \text{ Cytotoxicité}$

Discussion :

Après une formation d'une dizaine de jours à l'Institut Pasteur sur le protocole de culture cellulaire, ce test est mis en place à l'IRD (achat du matériel nécessaire, asepsie de la future salle de culture cellulaire, culture de neuroblastomes, éviter les contaminations, calibration).

Ce test aura deux objectifs : le premier, qui concerne ma problématique de stage, est de doser les effets des CTXs et des alcaloïdes neurotoxiques sur la viabilité de lignées cellulaires (tests effectués à partir de nos différents extraits sélectionnés) ; le deuxième consistera à mesurer l'activité « anticiguatoxique » des extraits de plantes (autre axe de recherche de l'UMR152). Dans ce contexte, ce test nous sert de bioguidage et son développement a permis un formidable gain de sensibilité, mais aussi de spécificité.

Malheureusement, mon stage se finissant, les extraits sélectionnés ne seront pas testés avant mon départ.

Aura-t-on une « augmentation » de la viabilité cellulaire (caractéristique de la présence de toxines à PSP) dans nos extraits hydrosolubles de bénomyls et de cyanobactéries, dans nos exudats de cyanobactéries, dans nos extraits de poissons ?

Y aura-t-il une diminution de la viabilité cellulaire du fait de la présence de ciguatoxines dans nos différents types d'extraits ?

Y aura-t-il donc une concordance entre les différents tests réalisés (test *in vivo* sur souris, CCM, test *in vitro* sur neuroblastomes) qui conforterait nos hypothèses ?

Conclusion

Une approche chimique multidisciplinaire est nécessaire pour une meilleure compréhension d'un phénomène type ciguatérogène.

Ces différents tests réalisés nécessitent tous une étape préalable d'extraction-purification. Aucune d'entre elles n'est donc adaptée à une détection des poissons à risque "sur le terrain". Elles ne peuvent être réalisées qu'en laboratoire et nécessitent, outre un personnel formé à leur pratique, des moyens parfois très onéreux. Cependant, le test *in vivo* sur souris nous permet d'estimer la toxicité globale

d'un extrait toxique brut. Aussi, avec le gain de sensibilité et de spécificité du test de cytotoxicité cellulaire, ce dernier est d'un intérêt précieux pour la recherche dans le domaine d'étude de la ciguatera.

L'intoxication massive avec des symptômes graves des habitants de Hunëtë a pour origine la correspondance spatiotemporelle de deux types de microorganismes toxiques complètement différents, les *Gambierdiscus* (Eucaryotes, Dinoflagellés) et des cyanobactéries benthiques (Procaryotes). Les conditions environnementales particulières (infrastructures éboulées, faible hauteur de la colonne d'eau) et la nature sporadique de la dynamique de ces deux types de microorganismes rendent difficile la prévision de l'évolution de la zone d'étude. On ne peut pas encore envisager d'anticiper les risques pour les habitants de Hunëtë ni de savoir si ce genre d'intoxication peut se reproduire ailleurs.

Etude prospective à Prony

Problématique

Les rejets organiques liés à l'implantation d'une base-vie vont-ils entraîner des efflorescences algales, un changement dans la toxinogénèse des microalgues existantes et finalement entraîner des flambées ciguatériques?

Les implantations portuaires seront-elles favorables au développement de macroalgues supports préférentiels de microalgues?

Choix des sites de prélèvement

La définition des sites de prélèvements prend en compte les différentes sources potentielles d'impact sur l'environnement. Nous avons choisis d'encadrer la zone de rejet des égouts de la base-vie (Figure 11, sites 1, 2 et 3), la zone portuaire (Figure 11, sites 3, 4 et 5) et l'ensemble de la baie de Prony (Figure 11, sites 2, 6 et 7). Les coordonnées des sites de prélèvements sont données en annexe 4. L'encadrement de la zone de rejet des effluents (Figure 11, émissaire) est prévu pour la suite de la mise en place du suivi.



Fig.11 : Carte de la baie de Prony avec les sites de prélèvements. Source : DITTT.

Prélèvements de microorganismes

J'ai collaboré à deux missions sur le terrain, de deux jours chacune, à Prony (le 24/25 juillet et le 20/21 septembre) (Figure 12).

Sur chaque site, on prélève trois échantillons de 150 grammes de *Turbinaria* sp.

Les algues sont mises dans un sac plastique avec de l'eau de mer, elles sont frottées et agitées vigoureusement pour déloger les microalgues. Le contenu du sac (suspension) est filtré successivement sur une batterie de tamis de 700, 200 et 35 micromètres. Le filtrat recueilli est conservé dans 30ml de formol à 5% et de l'eau de mer (Chinain *et al*, 1999a). La densité des cellules de *Gambierdiscus* sp. pour tous les sites est déterminée par comptage au microscope à l'aide d'une cellule de Malassez, les valeurs sont exprimées en cellule par gramme d'algue humide (Figure 13). En présence d'une efflorescence (densité supérieure à 1000 cellules par gramme d'algue humide), on retourne sur le site prélever 500 grammes de macroalgue qui sont traitées comme précédemment. Après la filtration de la suspension, les cellules sauvages sont concentrées par centrifugation à 2000g pendant 20 minutes et le culot est conservé à -20°C jusqu'à l'extraction pour l'analyse de toxicité (Chinain *et al*, 1999a).

Fig. 12 : Photographies de la mission à Prony du mois de septembre



Fig.13 : Vue au microscope binoculaire (1 cm = 40 μ m) de *Gambierdiscus* sp.
Source : photographies IRD.



Résultats

La présence de *Gambierdiscus* sp. n'a été relevée dans aucun des sites de prélèvement.

Discussion-Perspectives

La baie de Prony est un lieu réputé sans gratte, les résultats correspondent donc à notre attente. L'utilisation de la même méthodologie qu'à Hunëtë nous permet de

valider la baie de Prony comme témoin négatif quant à la présence de ciguatera et l'absence de microorganismes potentiellement toxiques dans la zone d'étude, en fait un point zéro privilégié pour la mise en place du suivi qui en découle.

Le projet d'implantation de cette usine métallurgique en Nouvelle-Calédonie, avec pour conséquence l'installation de nouvelles zones portuaires, des rejets minéraux et une augmentation des populations environnantes, constitue un facteur probable d'apparition du phénomène ciguatérique. Cette conjoncture nous permet de disposer d'un site exceptionnel pour une étude scientifique à long terme nous fournissant les moyens de mieux comprendre les relations entre une forte modification de l'environnement et le phénomène ciguatérique.

Conclusion

Cette étude originale en Nouvelle-Calédonie, porte sur deux sites : Hunëtë (Lifou) où l'impact anthropique pourtant relativement faible, a donné suite à de nombreux cas d'intoxications sévères, et Prony (Grande terre) qui est un site encore non toxique, mais où une forte anthropisation du milieu est inévitable.

La mission d'expertise réalisée à Lifou, et les tests effectués nous ont permis de mettre en évidence plusieurs sources de toxicité potentielles. La mise en place des suivis des populations de *Gambierdiscus* et de cyanobactéries du genre *Hydrocoleum*, et/ou *Trichodesmium* est donc essentielle pour prévenir les risques d'intoxications de type ciguatérique. Des prélèvements de ces microorganismes associés à ceux de poissons, de benthos et d'exudats de cyanobactéries seront de nouveau nécessaires pour constituer de la matière biologique afin de continuer notre approche chimique multidisciplinaire.

Le test de toxicité aiguë nous permet de vérifier la toxicité de nos extraits bruts.

Le test sur neuroblastomes nous servira de bioguidage et nous permettra donc de fractionner nos extraits sélectionnés.

Ces tests seront réalisés dans le but d'une meilleure compréhension d'un phénomène type ciguatérique.

Cette étude s'inscrit dans le cadre de sujets d'actualité en Nouvelle-Calédonie : la ciguatera et l'implantation d'usine de traitement du nickel. Or, la mise en place d'un suivi à Prony, simultanément avec l'augmentation de la pression anthropique, nous permettra d'aboutir à une meilleure compréhension des facteurs environnementaux susceptibles de favoriser ou non les flambées de type ciguatérique.

Cette étude permet donc d'orienter les recherches futures concernant l'implication des cyanobactéries dans les intoxications de type ciguatérique et de mettre en place une prévention adaptée en cas de risques élevés d'intoxications.

Bibliographies

Amade P., Laurent D., Bourdy G., Cabalion P. (1992) Traditional remedies used in the western pacific for the treatment of ciguatera poisoning. *Journal of Ethnopharmacology* 36:163-174.

Adachi R. & Fukuyo Y. (1979) The thecal structure of a marine toxic Dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* gen. et sp. nov. collected in a ciguatera-endemic area. *Bull Jap Soc Sci Fish* 45:67-71.

Bagnis R. (1969) Naissance et développement d'une flambée de ciguatera dans un atoll des Tuamotu. *Rev Corps Santé Armées* 10:783-795.

Bagnis R. (1981) L'ichtyosarcotoxisme de type ciguatera : phénomène complexe de biologie marine et humaine. *Oceanol Acta* 4:375-387.

Banner A. H. & Borouhns H. (1958) Observations on toxins of poisonous fishes. *Proc Soc Exp Biol Med* 98:776-778. in Bourdeau, P. 2004. La ciguatera et les toxines ciguatériques. Cours du Master "Toxines et Ecosystèmes" du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris :51 p.

Banner A.H., Shaw S.W., Alender C.B., Helfrich P. (1963) Intoxication par le poisson: Notes sur la ciguatera & son mode d'action & quelques suggestions thérapeutiques. Document Technique N°141, Commission du Pacifique Sud, Nouméa, Nouvelle-Calédonie, 19 p.

Benoit E., Laurent D., Mattei C., Legrand A-M., Molgo J. (2000) Reversal of pacific ciguatoxin-1B effects on myelinated axons by agents used in ciguatera treatment. *Cybum* 24: 33-40.

Boydron-Le Garrec R., Benoit E., Sauviat M.P., Frostin M., Laurent D. (*sous presse*) La ciguatera : de l'étiologie du phénomène au traitement des symptômes.

Calvert G.M., Hryhorczuk D.O., Leikin J.B. (1987) Treatment of ciguatera fish poisoning with amitriptyline and nifedipine. *Journal of Toxicology—Clinical Toxicology* 25: 423- 428.

Chinain M., Germain M., Deparis X., Pauillac S. & Legrand, A.M. (1999a) Seasonal abundance and toxicity of the dinoflagellate *Gambierdiscus* spp. (dinophyceae), the causative agent of ciguatera in Tahiti, French Polynesia. *Mar. Biol.* 135:259-267.

Chinain M., Faust M. & Pauillac S. (1999b) Morphology and molecular analyses of three toxic species of *Gambierdiscus* (Dinophyceae) : *G. pacificus*, sp. nov., *G. australes*, sp. nov., and *G. polynesiensis*, sp. nov. *J. Phycol.* 35:1282-1296.

Dechraoui M.Y., Naar J., Pauillac S. & Legrand A.M. (1999) Ciguatoxins and brevetoxins, neurotoxic polyether compounds active on sodium channels. *Toxicon*.37:125-143.

Dechraoui-Bottein M.Y. (1999) Etude du mode d'action des ciguatoxines, biotoxines marines responsables de la ciguatera : comparaison aux brévétoxines et application à la détection des poissons toxiques. Thèse Univ. Pacifique. 111 p.

Diogène G., Durand-Clément M. & Puisseux-Dao S. (1992) La ciguatera intoxication alimentaire d'origine marine et la maïtotoxine composante du complexe toxinique ciguatérique. *Revue Scientifique et Technique de la Défense* :37-47.

Endean R., Griffith J.K., Robins J.J., Llewellyn L.E., Monks S.A. (1993) Variation in the toxins present in ciguateric narrow-barred spanish mackerel, *Scomberomorus commersoni*. *Toxicon*, 31(6) : 723-732.

Endean R., Monks S.A., Griffith J.K., Robins J.J., Llewellyn L.E. (1993) Apparent relationships between toxins elaborated by the cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum* and those present in the flesh of the narrow-barred spanish mackerel, *Scomberomorus commersoni*. *Toxicon*, 31(9) : 1155-1165.

Fairey E. R., Bottein Dechraoui M.Y., Sheets M.F. & Ramsdell J.S. (2001) Modification of the cell based assay for brevetoxins using human cardiac voltage dependent sodium channels expressed in HEK-293 cells. *Biosensors & Bioelectronics* 16 :579-586.

Faust M. A. (1995) Observation of sand-dwelling toxic dinoflagellates (dinophyceae) from widely differing sites, including two new species. *J. Phycol.* 31:996-1003.

Fenner P. & Lewis R. (2001) Ciguatera (fish poisoning) In : (Rose M.G. & Griggs R.C. Ed.) *Channelopathies of the Nervous System*, Butterworth Heinemann, 295-307.

Hahn S.T. et Capra M.F. (1992) The cyanobacterium *Oscillatoria erythraea*, a potential source of toxin in the ciguatera food-chain. *Food additives and contaminants*, 9(4) : 351-355.

Hirama M., Oishi T., Uehara H., Inoue M., Maruyama M., Oguri H. & Satake M. (2001) Total synthesis of ciguatoxin CTX3C. *Science* 294:1904-7.

Holmes M. J. (1998) *Gambierdiscus yasumotoi* sp. nov. (Dinophyceae), a benthic dinoflagellate from southeastern Asia. *Journal of Phycology* 34 :661-668.

Inoue M., Miyazaki K., Uehara H., Maruyama M. & Hirma M. (2004) First- and second-generation total synthesis of ciguatoxin CTX3C. *Proc Natl Acad Sci U S A* .

Kogure K., Tamplin M.L., Simidu U. & Colwell R.R. (1988) A tissue culture assay for tetrodotoxin, saxitoxin and related toxins. *Toxicon* 26:191-197.

Lange W.R., Kreider S.D., Hattwick M., Hobbs J. (1988) Potential benefit of tocainide in the treatment of ciguatera: report of three cases. *The American Journal of Medicine* 84: 1087-1088.

Legrand A-M., Lotte C., Bagnis R. (1985) Respiratory and cardio-vascular effects of ciguatoxin in cats: antagonistic action of hexamethonium, atropine, propranolol, phentolamine, yohimbine, prazosin, verapamil, calcium and lidocaine. In : (Gabrie C., Toffart J.L., Salvat B. Eds.) Proceedings of the Fifth International Coral Reef Congress, June 27-May 1 1985, Antenne Museum-EPHE, Tahiti, French Polynesia, 4: 463-466.

Legrand A. M. & Bagnis R. (1991) La ciguatera: un phénomène d'écotoxicologie des récifs coralliens. Annales de l'Institut Pasteur. 253-266.

Lehane L. & Lewis R. (2000) Review Ciguatera : recent advances but risk remains. International Journal of Food Microbiology.61.91-125.

Lewis R. & Ruff T. (1993) Ciguatera : ecological, clinical, and socioeconomic perspectives. Critical Reviews in Environmental Science and Technology.23(2):137-156.

Lewis R.J. (1994) Immunological, biochemical and chemical features of ciguatoxins : implications for the detection of ciguateric fish. Memoirs of the Queensland Museum 34:541-548.

Lombet A., Bidard J.N. & Ladzunski M. (1987) Ciguatoxin and brevetoxins share a common receptor site on the neuronal voltage-dependent Na⁺ channel. FEBS Lett. 219:355-359.

Manger R. L., Leja L. S., Lee S. Y., Hungerford J. M. & Vekell M. M. (1993) Tetrazolium-based cell bioassay for neurotoxins active on voltage-sensitive sodium channels : semiautomated assay for saxitoxins, brevetoxins, and ciguatoxins. Anal. Biochem. 214:190-194.

Mattei C., Benoit E., Juzans P., Legrand A-M, Molgo J. (1997) Gambiertoxin (CTX-4B), purified from wild *Gambierdiscus toxicus* dinoflagellates, induces Na⁺-dependent swelling of single frog myelinated axons and motor nerve terminals in situ. Neuroscience Letters 234: 75-78.

Murata M., Legrand A.M., Scheuer P., Yasumoto T. (1992) ¹³C NMR assignments of ciguatoxin by inverse-detected 2D spectroscopy and an explanation of ¹H NMR signal broadening. Tetrahedron Lett.33 (4), 525-526 in Lehane, L. & Lewis, R.2000.Review Ciguatera : recent advances but risk remains. International Journal of Food Microbiology.61.91-125.

Nakahara H., Sakami T., Chinain M. & Ishida Y. (1996). The role of macroalgae in epiphytism of the toxic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. Phycological Research 44:113-7.

Perez C.M., Vasquez P.A., Perret C.F. (2001) Treatment of ciguatera poisoning with gabapentin. The New England Journal of Medicine 344: 692-693.

Poli M. A., Mende T. J. & Baden D. G. (1986) Brevetoxins, unique activators of voltage-sensitive sodium channels, bind to specific sites in rat brain synaptosomes. *Mol Pharmacol* 30:129-35.

Ruff T.A & Lewis R.J (1994) Clinical aspects of ciguatera: an overview. *Memoirs of the Queensland Museum* 34: 609-620.

Satake M., Murata M., Yasumoto T. (1993) The structure of CTX3C, a ciguatoxin congener isolated from cultured *Gambierdiscus toxicus*. *Tetrahedon Lett*, 34 : 1975-1978.

Scheuer P. J., Takahashi W., Tsutsumi J. & Yoshida T. (1967) Ciguatoxin : isolation and chemical nature. *Science* 155:1267-1268.

Stommel E.W., Jenkyn L.R., Parsonnet J. (1993) Another case of polymyositis after ciguatera toxin exposure. *Archives of Neurology* 50: 571-571.

Tebano T. et Lewis R. (1991) Ciguatera fish poisoning and reef disturbance : Observations on ciguatoxin level in reef fishes at Nei Tebaa Chanel, Dai Nippon Causeway, South Tarawa, Kiribati. Marine studies programme, University of South Pacific, Technical report, 6.

Vaillant V., Caumes E., De Valk H., Mesnage V., Griffon A.M. (2001) Intoxication alimentaire à la ciguatera : savoir l'évoquer même en l'absence de voyage. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* N°38 [en ligne].

Yasumoto T., Bagnis R. & Vernoux J. P. (1976) Toxicity of the surgeonfishes. II - Properties of the principal water-soluble toxin. *Bull Jap Soc Sci Fish* 42:359-365.

Annexes

Médecin ou biologiste déclarant (tampon) Nom : Hôpital/service Adresse Téléphone Télécopie Signature	DDASS : signature et tampon
--	-----------------------------



Important : cette maquette justifie une intervention urgente locale, nationale ou internationale. Vous devez la signaler par tout moyen approprié (téléphone, télécopie, ...) au médecin inspecteur de la DDASS avant même confirmation par le CNH ou envoi de cette fiche.

Date de la notification : _____

Nombre de malades : Nombre de malades hospitalisés : Nombre de malades décédés :

Caractéristiques des malades :								
Cas	Age	Sexe	Code postal du domicile	Date et heure de début des signes cliniques	Signes cliniques : N = nausées, D = diarrhée F = fièvre, V = vomissements, A = douleurs abdominales	Analyses microbiologiques Isolé, non isolé, inconnu	Résultats : négatif ou positif (si +, préciser l'agent : Salmonella, Staphylococcus, Campylobacter...)	Complications : DCU = décès, H = hospitalisation
Ex :	21	F	42 500	1 février à 12h	V D F A	Isolé	S. Enteritidis	H
N° 1								
N° 2								
N° 3								
N° 4								
N° 5								
N° 6								
N° 7								
N° 8								
N° 9								
N° 10								

Analyses microbiologiques dans les aliments (recherche de germes ou de toxines) :

☐ positif ☐ négatif ☐ non faite

Si analyses positives, préciser l'agent :

Si analyses négatives ou non faites chez les cas ou dans les aliments, quels sont les agents suspectés (le ou les 2 plus probables) ?

1 =
2 =

Toxi-infection alimentaire collective

Critères de notification : survenue d'au moins deux cas similaires d'une symptomatologie, en général gastro-intestinale, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire

Origine de l'intoxication :

Date du repas : _____ Heure du repas : _____ Département du repas : _____

Nombre de personnes ayant participé au repas :

- Lieu du repas :
- ☐ Familial
 - ☐ Restaurant
 - ☐ Collectivité
 - ☐ Scolaire
 - ☐ Institut Médico-Social (hôpital, crèche, maisons de retraite, CAT, MAS)
 - ☐ Restaurant d'entreprise
 - ☐ Autre collectivités - Préciser :

Aliment(s) consommé(s) suspecté(s) :

Origine de(s) aliment(s) suspecté(s) (ex : supermarché, production locale, production familiale) :

Commentaires (circonstances)

.....

Malade à déclaration obligatoire (Art L 3111-1, R11-1, R11-2, R11-4, D11-1 du Code de la santé publique)
 Information individuelle des personnes : Droit d'accès et de rectification pendant 6 mois par le médecin déclarant (loi du 6 janvier 1978) - Centralisateur des informations à l'Institut de veille sanitaire

1.a : Formulaire de déclaration d'une Toxi-Infection Alimentaire Collective de l'Institut de Veille Sanitaire (InVS. Source :
http://www.invs.sante.fr/surveillance/mdo/fiches/fiche_toxi_infection.pdf

Commission du Pacifique Sud
FORMULAIRE DE DECLARATION D'UNE INTOXICATION DUE A LA
CONSOMMATION DE PRODUITS DE LA MER

Veuillez répondre en détail à toutes les questions. Cochez la case appropriée.

Identité du déclarant	
Nom _____	Profession/ titre _____
Adresse _____	
Date _____	Signature _____

Identité de la personne intoxiquée	
Nom _____	Sexe (M/F) _____ Age _____ ans
Adresse _____	

Renseignements sur le produit de la mer qui a provoqué cette intoxication <i>(Veuillez cocher les cases appropriées)</i>					
Type de produit	Lieu de capture	Mode de conservation	Morceau consommé	Méthode de préparation culinaire	
Poisson ☐	Rivière ☐	Frais, sans glace	☐ Tête	☐	
Sans préparation (cru) ☐					
Crabe ☐	Mangrove ☐	Frais, sur glace ☐	Chair ☐	Mariné ☐	
Langouste ☐	Plage ☐	Congelé ☐	Peau ☐	Cuit ☐	
Autres crustacés ☐	Paté corallien ☐	Salé ☐	Foie ☐		
Gastéropode* ☐	Lagon ☐	Séché ☐	Oeufs ☐	Combien d'autres personnes _____	
Bivalve* ☐	Récif-barrière ☐	Fumé ☐	Autres organes _____	(précisez) ont mangé cet aliment? _____	
Autres mollusques ☐	Pleine mer ☐	Saumuré ☐	_____	ont été malades? _____	
Autres (précisez) _____	Autres (précisez) _____	Autres (précisez) _____	_____	ont été admises _____	
Inconnu ☐	Inconnu ☐	Inconnu ☐	Inconnu ☐	à l'hôpital? _____	
Nom local de cet aliment? _____					
Nom français _____					
Nom du vendeur ou du restaurant (en cas d'achat) _____					
Nom du lieu de pêche (si possible) _____					
Aliment consommé le _____ à _____ heures					
Apparition des premiers symptômes (date) _____ à _____ heures					
*Les gastéropodes sont des fruits de mer coquille simple comme les escargots, les trocas, les strombes, etc. Les bivalves sont des fruits de mer à deux coquilles comme les palourdes, les moules, les coques, les huîtres, etc.					

Symptômes <i>(Veuillez cocher les cases appropriées)</i>			
Brûlure ou douleur au contact de l'eau froide ☐	Picotements au contact d'eau ☐		
Fourmillements ou engourdissement ☐	Goût bizarre dans la bouche ☐		
Miction difficile ou douloureuse ☐	Démangeaisons ou rougeurs ☐		
Respiration difficile ☐	Salivation excessive ☐	Fièvre ou frissons ☐	
Marche difficile ☐	Transpiration excessive ☐	Maux de tête ☐	
Difficulté d'élocution ☐	Diarrhées ☐	Douleurs articulaires ☐	
Irritation des yeux ☐	Vomissements ☐	Crampes ☐	

Renseignements médicaux		
Poids _____	Tension artérielle _____	Pupilles _____

En cas de décès	
Date du décès _____	Conclusions de l'autopsie _____
Autres renseignements _____	

Veuillez renvoyer ce formulaire à la Commission du Pacifique Sud, B. P. D5, Nouméa
CFDEX, Nouvelle-Calédonie

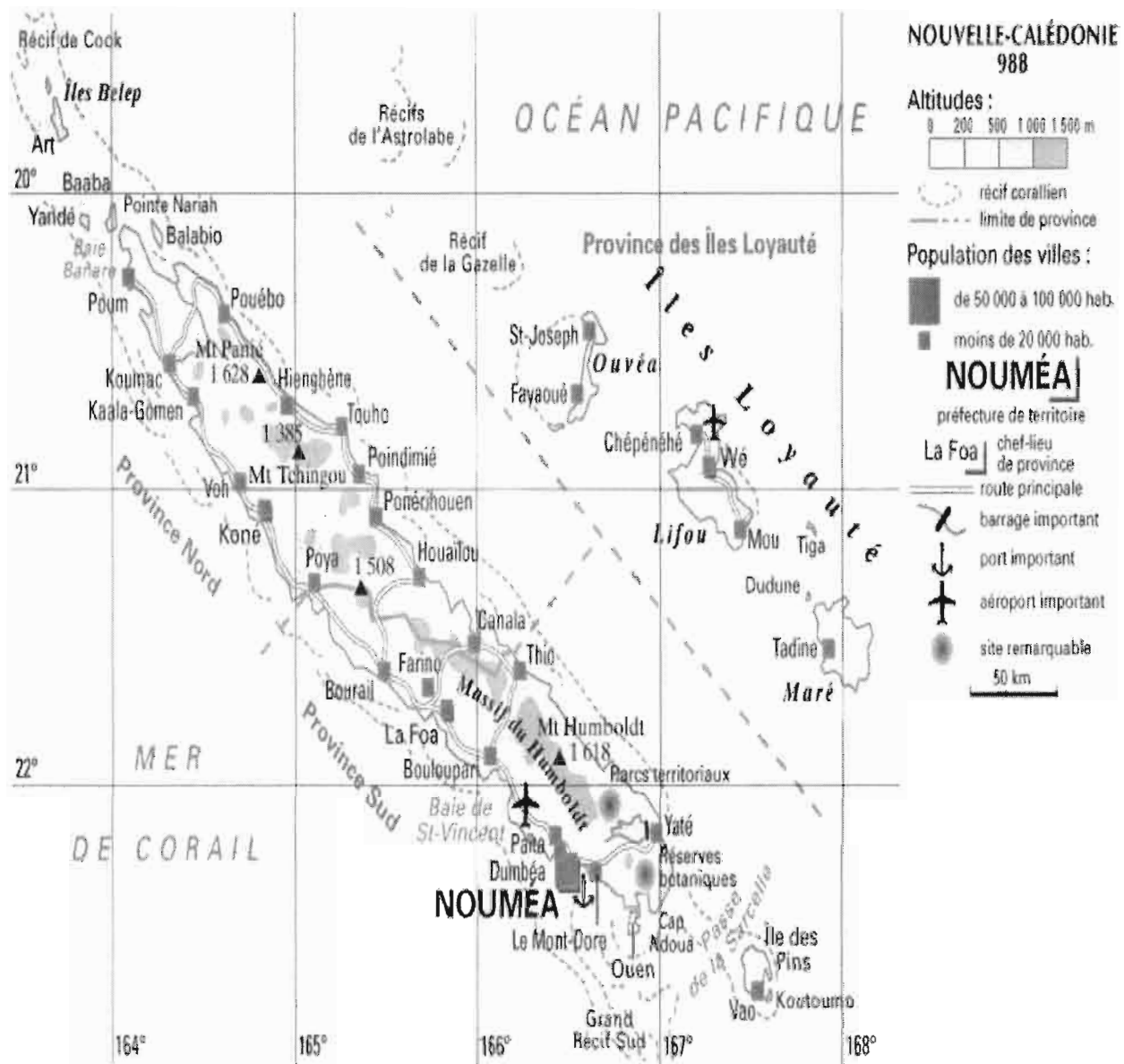
MERCI

1.b : Formulaire de déclaration d'une intoxication due à la consommation de produits de la mer de la Commission du Pacifique Sud (CPS. Source : <<http://www.spc.int/coastfish/News/CiguateraVF/Ciguatera%20form-French.pdf>>).

2 : La Nouvelle-Calédonie (Grande terre et îles Loyauté)

Lifou : la tribu de Hunët se trouve au niveau de Chépénéhé (île Loyauté)

La baie de Prony se trouve entre l'île Ouen et le Cap Ndoua (Grande terre)



3 : Tableau utilisé lors de notre test biologique de toxicité aiguë sur souris rassemblant les paramètres nécessaires

Cage N°				
Souris N° :	Poids de la souris (g) :		Sexe :	
Paramètres d'injection				
Nature :	Quantité (mg) :	Volume (µL) :	Conc (mg/µL) :	Heure :
<u>Temps :</u>	<u>Observations :</u>			

4 : Coordonnées et observation des sites de prélèvement dans la baie de Prony (Fig.11)

N°	Nom GPS	Site	Coordonnées géographiques	Critères géographiques	caractéristiques écologiques
1	Dom01	face Wharf sortie ouest rade du Nord (point 4 de Fig.11)	22°20,600-166°51,837	pointe ouest de la rade du Nord, prélèvement à 20m du bord sur 100m à partir de la pointe	bonne abondance de <i>Turbinaria</i> (BAT), riche biodiversité
2	Dom02	ilôt Gabriel (point 1)	22°19,894-166°52,082	sur la côte Nord de l'ilôt, un peu plus à l'Est, sur zone de 30m à partir de la plage	biodiversité coralliennes, algues et de poissons, BAT
3	Dom03	Pointe est-entrée de la Baie (point 6)	22°23,471-166°53,331	entrée de la baie, juste après le platier, sur la gauche, en longeant la côte sur 100m	platier et patates éparses, faible abondance de <i>Turbinaria</i> , qqs échantillons clairsemés au niveau des infractuosités des patates, très riche biodiversité animale
4	Dom04	Face ilôt Casy (point 7)	22°21,847-166°49,945	pointe ouest-"sortie" de la baie en face, au niveau des patates en bord de plage (à 10m)	zone fortement brassée, BAT, biodiversité de faune (méduses)
5	Dom05	sortie est Rade du Nord (Point 3)	22°20,334-166°52,636	plage en sortie est de la rade de la rade du Nord, encadrement des sorties d'effluents, sur une zone de 50-60m jusqu'au platier	zone riche en <i>Turbinaria</i> mais parsemée, au niveau du platier nombreuses <i>Halimeda</i> au milieu de coraux branchus morts
6	Dom06	vieux wharf (entre point 3 et point 5)	22°20,565-166°53,001	zone à gauche du vieux wharf en venant de la mer, zone très sédimentée	zone de <i>Sargassum</i> et de <i>Turbinaria</i> (BAT) à 20m du bord après une zone de coraux morts, bonne diversité algale
7	Dom07	nouveau wharf (point 5)	22°21,008-166°53,455	à 50-60 m à droite du nouveau wharf en venant de la mer	BAT après une zone de coraux morts à 30m du bord de la plage, zone très sédimentée
8	Dom08	pointe wharf (point 5)	22°21,448-166°53,804	avant la 2ème pointe rocheuse après le nouveau wharf	BAT au niveau de la pointe rocheuse, rocher avec huîtres, riche biodiversité corallienne sans abondance particulière, <i>Sargassum</i>