

Ralph PAWLOWIEZ^{1*}, Taiana DARIUS¹, André UNG¹, Dominique LAURENT², Yannick GUEGUEN³, Marcel LE PENNEC⁴ et Mireille CHINAIN¹.

1 : Institut Louis Malardé (ILM), BP 30, 98713 Papeete-Tahiti, Polynésie française

2 : UMR 152 IRD-UPS, BP 529, 98713 Papeete-Tahiti, Polynésie française

3 : Ifremer BP 7004, 98719 Taravao-Tahiti, Polynésie française

4 : Université de la Polynésie française (UPF), Laboratoire Biodiversité Terrestre et Marine (BIOTEM), 98702 Faa'a-Tahiti, Polynésie française

* : auteur correspondant rpawlowiez@ilm.pf

Introduction

La ciguatera est une intoxication liée à la consommation de poissons lagunaires contaminés par de puissantes neurotoxines : les ciguatoxines. Chaque année, environ 50.000 à 500.000 personnes sont affectées par cette pathologie dans le monde. Avec un taux d'incidence de 2 à 400 cas/100 000 habitants en 2008 selon l'île et l'archipel considéré, la ciguatera reste une pathologie fréquente en Polynésie française. En particulier, on note une augmentation préoccupante du nombre d'intoxications aux Australes depuis 2009, considéré jusqu'en 1984 comme l'archipel le moins à risque de ciguatera. On assiste également à la réémergence en Polynésie d'intoxications par consommation d'invertébrés marins tels que les bénitiers (*Raivavae*) et les oursins (*Rurutu*), vraisemblablement liées à la prolifération de cyanobactéries marines benthiques dans les lagons polynésiens.

Il est donc urgent de doter le laboratoire d'une expertise mieux « adaptée » à ces formes d'intoxication, en développant un test qui permette la détection de la toxicité « globale » d'un échantillon, incluant aussi bien la toxicité induite par les ciguatoxines (CTXs) que celle induite par d'autres toxines. Le test de cytotoxicité sur lignée cellulaire Neuro-2a représente une bonne alternative, tant par sa sensibilité, que par son aptitude à détecter un large spectre de biotoxines marines.

Objectifs

Cette étude vise à implanter le test de cytotoxicité sur Neuro-2a « en routine » au laboratoire, suivant les étapes de : (i) optimisation/standardisation du test (le choix du type cellulaire Neuro-2a, la densité cellulaire, les temps d'incubation, les concentrations des réactifs ouabaïne/vératridine (O/V), MTT/DMSO, etc...); (ii) calibration à partir de ciguatoxines pures ou standards CTXs; (iii) et application aux extraits de la micro-algue *Gambierdiscus*.

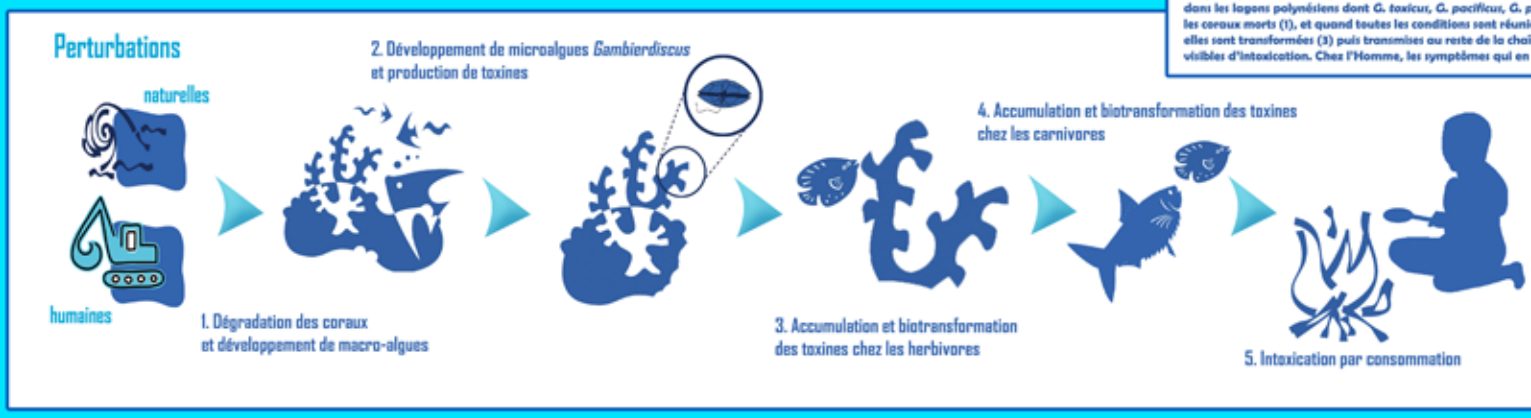


Figure 1 : Chaîne trophique de la ciguatera. Les principaux agents responsables de cette intoxication, sont les micro-algues benthiques du genre *Gambierdiscus*. A ce jour, quatre espèces ont été observées dans les lagons polynésiens dont *G. toxicus*, *G. pacificus*, *G. polyemesis* et *G. australis*. Ces dinoflagellés se développent autour de macro-algues qui tapissent les coraux morts (1), et quand toutes les conditions sont réunies, biosynthétisent des toxines (dont CTXs) (2). Une fois celles-ci ingérées par les poissons herbivores, elles sont transformées (3) puis transmises au reste de la chaîne alimentaire (4) jusqu'à l'Homme (5). En revanche, seuls les mammifères présenteront des signes visibles d'intoxication. Chez l'Homme, les symptômes qui en découlent sont très variés en raison des différentes formes de CTXs existantes.

Matériel et méthodes

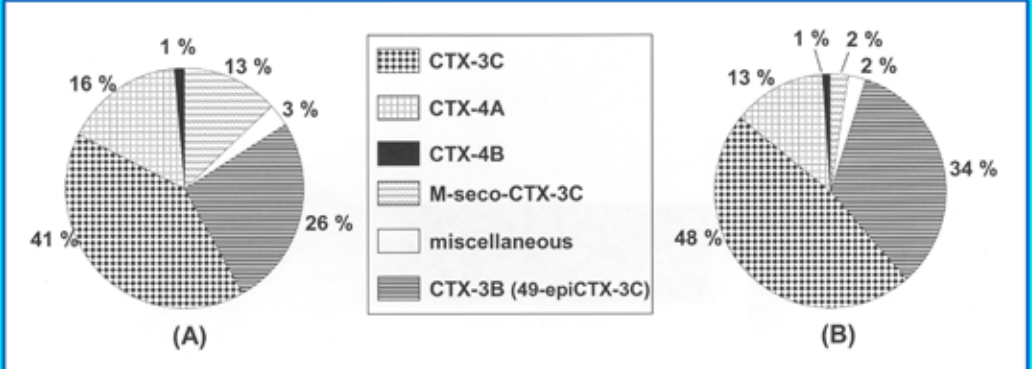


Figure 2 : Profils en CTXs chez *Gambierdiscus polyemesis*. Il existe plus d'une vingtaine de CTXs isolées à partir de différents molluscs de la chaîne trophique. Ce résultat a permis de mettre en évidence une accumulation et une biotransformation des toxines suivant le mollusque étudié. Chez *G. polyemesis* TB-92 (A) et RG-92 (B) en culture, le profil en CTXs a été étudié^[1] et montre une présence majoritaire des CTXs suivantes : P-CTX-3C, la P-CTX-3B, la P-CTX-4A et la M-seco-P-CTX-3C.

Ciguatoxine	PM en g.mol ⁻¹
P-CTX-3B	1022
P-CTX-3C	1022
M-seco-P-CTX-3C	1040
P-CTX-4A	1060

Tableau 1 : Les standards CTXs utilisés pour la calibration du test

Référence de la souche	Espèce	Statut toxinique*
TB-92 ^{1,4}	<i>G. polyemesis</i>	CTX ⁺
RAI-1 ¹	<i>G. polyemesis</i>	CTX ⁺
RG-92 ⁴	<i>G. polyemesis</i>	CTX ⁺
GIT-91 ^{1,4}	<i>G. toxicus</i>	CTX ⁺
HO-91 ^{1,4}	<i>G. pacificus</i>	CTX ⁺
HIT-0 ⁴	<i>G. toxicus</i>	CTX ⁻

* CTX⁺ : productrice de ciguatoxines et CTX⁻ : non productrice de ciguatoxines. La gamme de dilution des souches testées est : 8.10⁻⁵, 8.10⁻⁶, 8.10⁻⁷, 8.10⁻⁸, 8.10⁻⁹, 8.10⁻¹⁰, 8.10⁻¹¹ eqvcell.ml⁻¹.

Tableau 2 : Les souches de *Gambierdiscus*

Culture Neuro-2a en flacon

- Trypsination (passage P)
- Comptage
- Densité cellulaire

Ensemencement des microplaques

- 35000-50000 cellules par puits
- Volume par puits = 100µL
- Incubation 24h à 37°C-5% CO2 pour une confluence entre 75-100%

Test de l'échantillon

- Traitement des cellules par O/V
- Dépôt de l'échantillon (2µL par puits)
- Incubation 20-22h à 37°C-5% CO2

Lecture des microplaques

- Coloration au MTT
- Incubation 60min à 37°C-5% CO2
- Solubilisation par du DMSO
- Incubation 5min avec agitation
- Lecture à 570nm

Traitement des données

- Analyse des résultats au moyen du logiciel GraphPad Prism v4
- Calcul des IC₅₀ par échantillon

Figure 3 : Protocole du test de cytotoxicité. Les paramètres ont été optimisés/standardisés d'après les travaux de Bottein-Dechraoui et al.^[1], Cañete et Diogène^[2] et Manger et al.^[3]. La durée totale d'un test est de 48h.

Résultats

Paramètres optimisés

Type cellulaire	Neuro-2a
Nombre de passages	Entre 10P et 30P
Densité cellulaire	35.000 - 50.000 cellules / puits
Volume d'ensemencement	100µL
Temps d'incubation	24h
Concentration Ouabaïne/Vératridine	500/50 (µM)
Solubilisation des échantillons	MeOH
Temps d'incubation avec toxines	20-22h
Lecture des microplaques	60µL MTT (1mg/ml) / puits
Temps d'incubation	60min
Solubilisation du MTT Formazan	100µL DMSO / puits
Temps d'incubation	5min

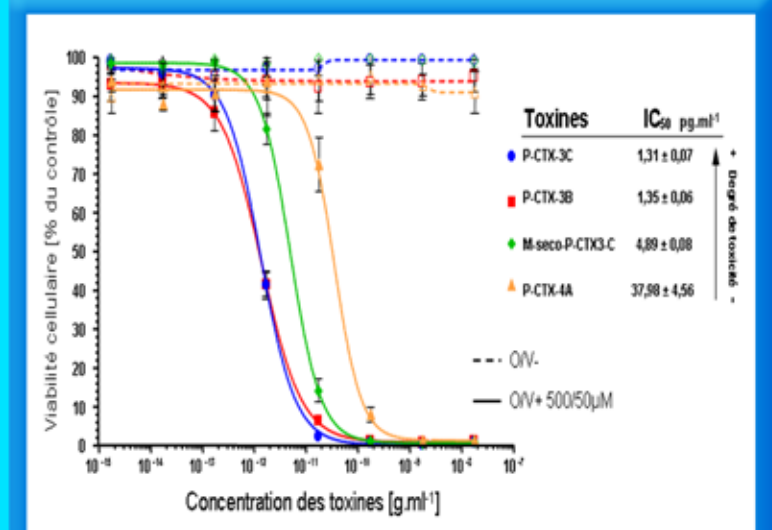


Figure 4 : Calibration du test à partir des standards CTXs. Le test a d'abord été calibré avec des toxines pures. Pour chaque toxine, huit dilutions ont été testées en triplicate pour 3 microplaques avec ou sans ouabaïne/vératridine (O/V). La moyenne et l'écart-type ont été calculés pour chaque point (Graphpad Prism4). Les valeurs d'IC₅₀ de ces ciguatoxines sont de l'ordre du picogramme/ml avec la P-CTX-3B et la P-CTX-3C étant significativement plus toxiques que la M-seco-P-CTX-3C et que la P-CTX-4A. Ces résultats montrent que ces ciguatoxines ont un effet toxique sur les Neuro-2a, 300 à 50000 fois plus fort que les brevatoxines PbTx-1 (12,4 ng.ml⁻¹), et PbTx-3 (65,6 ng.ml⁻¹)^[5]. La ciguatoxine des Caraïbes C-CTX-1 (20 pg.ml⁻¹) a un effet comparable à celle du Pacifique^[1].

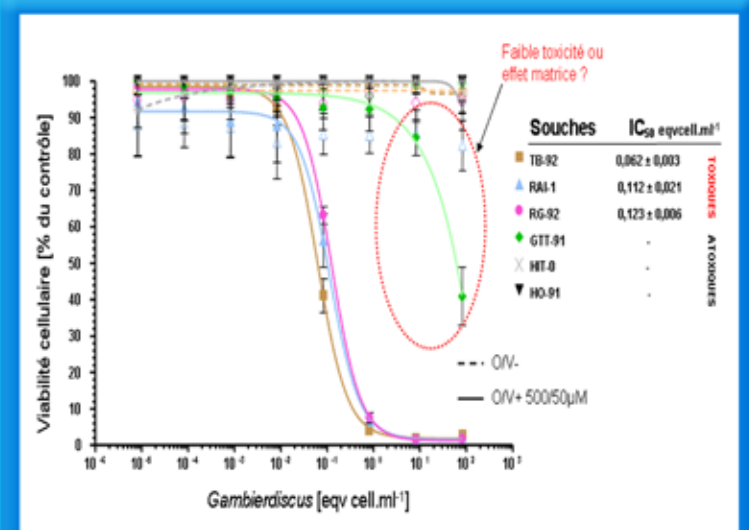


Figure 5 : Application aux extraits de culture de 6 souches de *Gambierdiscus*. Le test a ensuite été appliqué aux extraits de souches de *Gambierdiscus*. Pour chaque extrait, huit dilutions ont été testées en triplicate pour 3 microplaques avec ou sans ouabaïne/vératridine (O/V). La moyenne et l'écart-type ont été calculés pour chaque point (Graphpad Prism4). Parmi les souches toxiques, TB-92 est approximativement deux fois plus toxique que la RAI-1 et la RG-92. La non toxicité observée des souches GIT-91, HO-91 et HIT-0 est cohérente avec les résultats de Chinain et al. 2009^[4]. Cependant, pour la souche GIT-91 atanique, on note une diminution « significative » de la viabilité cellulaire à partir de la dilution 8 eqvcell.ml⁻¹, vraisemblablement due soit à une faible toxicité non observée jusqu'à présent, soit à un effet « matrice » combiné à la qualité de l'échantillon. Ce phénomène n'est pas observé pour les deux autres souches ataniques HO-91 et HIT-0 dans cette gamme de dilution.

Conclusions et perspectives

En Polynésie française, la population est fortement dépendante de ses ressources marines pour son alimentation quotidienne en particulier dans les îles des archipels éloignés. Cependant, la consommation de produits de la mer (poisson, bénitier, oursin) n'est pas sans risque du fait de la présence de biotoxines marines dans la chaîne alimentaire. De ce fait, la mise en place d'un outil polyvalent permettant de détecter un large spectre de biotoxines marines, s'avère indispensable pour veiller à la sécurité alimentaire de ces produits très prisés par la population.

Dans cette étude, le test de cytotoxicité sur lignée cellulaire Neuro-2a a été choisi et mis en place au laboratoire. Ce test calibré sur les ciguatoxines standards montre un niveau de détection très sensible (de l'ordre du pg.ml⁻¹), et permet la détection des CTXs présentes dans les souches de culture de *Gambierdiscus*. Une fois les conditions optimales établies, cette technique est relativement facile à mettre en oeuvre et donne des résultats reproductibles.

Une application de ce test sur des matrices biologiques telles que la chair de poisson, la chair de bénitier, les gonades d'oursins potentiellement à risque est en cours de réalisation. Par ailleurs, l'adaptation de cette technique à la détection des polytoxines est également en développement.

A terme, ce test permettra d'accroître notre expertise dans la détection de diverses biotoxines marines pour une meilleure prévention des risques d'intoxication pour le consommateur polynésien.

Bibliographie

- [1] Bottein-Dechraoui et al., 2005. *Toxicon* 46, 261-270
- [2] Cañete et Diogène, 2008. *Toxicon* 52, 541-550
- [3] Chinain et al., 1999. *J. Phycol.* 35, 1282-1296
- [4] Chinain et al., 2009b. *Toxicon*, doi : 10.1016/j.toxicon.2009.06.013
- [5] Manger, 1993. *Analyt. Biochem.* 76, 120-128

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier la Délégation à la Recherche de la Polynésie française pour le financement de cette thèse, puis Marie-Yasmine Bottein Dechraoui, du laboratoire de la NOAA, USA, qui a bien voulu fournir un lot de cellules Neuro-2a « en bon état », également pour ses conseils et ses recommandations, ainsi que l'IRTA, Espagne, et enfin Marie Solignac pour son aide précieuse sur ce poster.

