

COMMISSION DU PACIFIQUE SUDSEMINAIRE SUR L'ICHTYOSARCOTOXISME

(Rangiroa, Polynésie Française, 16-22 août 1968)

LES CRABES TOXIQUES DES ILES RYŪ-KYŪ ET AMAMI
ET LES ANALOGIES ENTRE LA TOXINE DU CRABE ET LA SAXITOXINE

par Shoji Konosu et Yoshiro Hashimoto*

Au cours d'une enquête sur la ciguatera dans les îles Ryū-Kyū et Amami, nous avons constaté que la croyance populaire attribue principalement à des crabes vénéneux l'origine de la toxine qui rend les poissons ciguatérogènes. On nous a également signalé des cas sporadiques d'empoisonnement - tant chez l'homme que chez les animaux domestiques - consécutifs à l'ingestion de crabes toxiques. La croyance susmentionnée nous a paru mériter d'être étudiée afin de mieux comprendre le problème de la ciguatera. C'est dans cet esprit que nous nous sommes penchés sur les cas d'intoxications par le crabe et les espèces toxiques de crabes.

Nous avons découvert que trois espèces toxiques, à savoir Zosimus aeneus, Platyrodia granulosa (Y. Hashimoto et al.: *Toxicon*, 5, 85, 1967) et Atergatis floridus (A. Inoue et al.: *Toxicon*, sous presse), contiennent une puissante neurotoxine identique à la saxitoxine (toxine paralysante du crustacé) ou très voisine, mais apparemment différente de la tétrodotoxine (toxine du poisson-globe) (S. Konosu et al.: *Toxicon*, sous presse).

Les résultats de cette enquête sont consignés dans le présent rapport.

Enquête épidémiologique

Nous avons fait une étude rétrospective de dix cas d'intoxication - dont quelques-uns douteux - dans les îles Amami et de neuf cas dans les îles Ryū-Kyū. Les malades avaient consommé soit du crabe bouilli, soit de la soupe de crabe. Le syndrome, caractérisé par des vomissements, la paralysie et une évolution mortelle rapide, pourrait indiquer que la toxine est du type paralysant. Voici la description d'un cas typique.

Dans la matinée du 30 mai 1968, un homme (A, 52 ans), son épouse (B, 49 ans), un de leurs fils (C, 9 ans) et deux parents, (D et E), habitant la ville de Naze, sont empoisonnés par un crabe connu localement sous le nom de "Hamugan". L'issue est mortelle chez A et B.

Le crabe incriminé avait été cuit vers 6h30 avec trois langoustes et un autre crabe comestible et servi en "miso" (soupe) pour le petit déjeuner. A et B ont bu chacun trois bols de soupe; C a mangé la chair des pinces et une petite quantité de soupe, tandis que D et E prenaient la queue des langoustes. Peu après le repas, A commence à se sentir souffrant. Voyant qu'un porc auquel on avait donné les restes du "miso" était pris de vomissements, puis succombait, il comprend qu'il est empoisonné. Il meurt vers 11 heures. B, qui était partie colporter d'autres crabes après le petit déjeuner, s'effondre sur la route. Lorsqu'on la trouve, elle ne peut ni parler ni bouger. Le décès intervient vers 10 heures.

* Laboratoire de biochimie marine, Faculté d'agriculture, Université de Tokyo.

Pris de malaise et atteint de paralysie au niveau des pieds, C est hospitalisé en même temps que D et E. Une piqûre émétisante lui fait rejeter tout ce qu'il a ingéré. Au bout de quelques jours, il est complètement rétabli. Les légers symptômes de paresthésie et d'aphasie qui se sont manifestés chez D et E cèdent rapidement devant le traitement.

Six poules qui ont absorbé les matières vomies par A sont trouvées mortes par la suite.

Recherche systématique de crabes toxiques

Les récifs coralliens de ces îles semblent être l'habitat de plusieurs espèces toxiques, mais nous n'avons pu obtenir aucune information sérieuse concernant la biologie de ces crustacés. Aussi avons-nous entrepris des tests systématiques de vérification de la toxicité chez quelque 1.000 spécimens - appartenant à 56 espèces - récoltés dans les îles Ryu-Kyu et Amami. La plupart de ces tests ont été pratiqués selon le schéma suivant.

Découpage des crustacés en deux moitiés symétriques - Broyage fin d'une moitié au mortier - Extraction d'un gramme de broyat avec 9 ml d'eau pendant 5 minutes dans l'eau bouillante - Filtrage après refroidissement - Injection de 0,5 ml de l'extrait, par voie intrapéritonéale, à une souris pesant une vingtaine de grammes. Généralement, ces extraits toxiques provoquent la mort des souris dans les vingt minutes suivantes. Dans le cas contraire, le crabe est jugé inoffensif.

Trois espèces se sont avérées vénéneuses, ce sont Z.aeneus, P.granulosa et A.floridus. A.floridus est également toxique sur la côte sud de Honshū. Une enquête de contrôle au cours de laquelle nous avons montré aux malades les différents crabes toxiques a confirmé que Z.aeneus était le responsable de la plupart des empoisonnements survenus dans les îles Amami.

Réaction des animaux de laboratoire à la toxine du crabe

L'injection d'une dose mortelle par voie intrapéritonéale engendre chez la souris les manifestations suivantes: agitation, paralysie des membres arrière, démarche vacillante, respiration saccadée, bonds et, enfin, la mort. L'autopsie pratiquée immédiatement après le décès n'a mis en évidence aucune modification importante des organes internes. Le coeur continue à battre pendant plus de 30 minutes.

Afin de déterminer la rapidité d'effet des doses mortelles, la solution de base de la toxine de Z.aeneus partiellement purifiée (la dose mortelle limite pour la souris étant de 0,04 y/g de poids vif) a été diluée dans l'eau à des concentrations diverses. Pour chacune de ces concentrations, une portion de 0,5 ml a été injectée par voie intrapéritonéale à 7 souris pesant chacune une vingtaine de grammes, et on a mesuré la rapidité d'effet. La courbe obtenue est semblable à celles que donnent la tétrodotoxine et la saxitoxine. On en a conclu que les méthodes de recherche de ces neurotoxines chez la souris sont applicables à la toxine du crabe.

Chez les chats le décès intervient rapidement après absorption de la toxine par voie orale ou par injection sous-cutanée. Les symptômes qui le précèdent sont: vomissements violents et paralysie des membres.

Toxicité comparée de trois espèces de crabes

On a fractionné les crabes selon les parties du corps (membres et céphalothorax) ou en plusieurs portions. Chaque portion a été hachée et soumise à une extraction par l'eau selon la méthode décrite plus haut. La dose mortelle suffisante pour tuer une souris en 10 à 15 minutes a ensuite été déterminée en injectant 0,5 ml de ces extraits par voie intrapéritonéale à des souris pesant une vingtaine de grammes. On a mesuré la toxicité à partir de la rapidité moyenne d'effet à ce taux de dilution et de la courbe dose/rapidité d'effet. Pour indiquer la quantité de toxine, on définit une unité-souris (U.S.) correspondant à la dose mortelle suffisante pour tuer une souris de 20 g de poids vif, selon la méthode communément adoptée dans le cas de la saxitoxine.

On a ainsi constaté une variation individuelle marquée entre la toxicité de chacune des trois espèces étudiées. L'examen de 94 crabes de l'espèce Z.aeneus, de 45 A.floridus et de 28 P.granulosa a montré que la toxicité et la fréquence des individus vénéneux étaient plus élevées chez la première des espèces citées. A.floridus vient au second rang, tandis qu'on n'a trouvé que trois P.granulosa pathogènes.

En règle générale, les appendices sont plus toxiques que le céphalothorax. Il est aussi intéressant de noter que l'exosquelette tant des appendices que du céphalothorax contient une quantité considérable de toxine. La toxicité des viscères, des muscles et des organes respiratoires semble inférieure à celle des appendices.

Quelques propriétés chimiques de la toxine du crabe

Ces propriétés ont été étudiées en utilisant les extraits à l'eau chaude obtenus à partir de Z.aeneus et les essais sur souris.

Après avoir modifié le pH par addition de HCl ou de NaOH , les extraits ont été conservés au bain-marie à ébullition pendant 15 minutes. A pH 3, la toxicité reste constante, alors qu'elle est réduite de moitié à pH 10. Le résidu sirupeux obtenu par évaporation a été utilisé pour des essais d'extraction par des solvants organiques; la toxine est extraite complètement par le méthanol, très imparfaitement par l'éthanol et pas du tout par le diéthyl éther, l'éther de pétrole, l'hexane, le chloroforme et le n-butanol. Elle n'est pas fractionnée dans le diéthyl éther, l'éther de pétrole et le chloroforme, dans le cas de solutions aqueuses dont le taux d'acidité est porté à pH 2 par addition de HCl ou à pH 10 par addition de NaOH et de NH_4OH . Elle est facilement dialysable à travers une membrane de cellophane.

Purification de la toxine du crabe

La méthode chromatographique par colonne d'échange d'ions mise au point par Schantz et al. (J. Am. Chem. Soc., 79, 5230, 1957) pour la saxitoxine purifie très efficacement la toxine du crabe. On trouvera en figure 1 un exemple des résultats obtenus dans la purification de la toxine de Z.aeneus.

Appendices de Z.aeneus

<u>Extraits aqueux</u>	(U.S. totales 175×10^3) (6,5 U.S./mg solide)
	Chromatographie sur Amberlite IRC-50
<u>Première fraction fortement toxique</u>	(U.S. totales 110×10^3) (680 U.S./mg solide)
	Chromatographie sur Amberlite IRP-64
<u>Deuxième fraction fortement toxique</u>	(U.S. totales 80×10^3) (1.510 U.S./mg solide)
	Rechromatographie sur Amberlite IRP-64
<u>Troisième fraction fortement toxique</u>	(U.S. totales $61,5 \times 10^3$) (1.760 U.S./mg solide)

Fig.1 Purification de la toxine du crabe

Le comportement de la toxine du crabe sur les colonnes est presque identique à celui de la saxitoxine tel que le décrivent Schantz et al. Ces traitements multiplient par 270 la toxicité des extraits initiaux, avec un taux de récupération de 35%

Comparaison de la toxine du crabe avec la saxitoxine et la tétródotoxine

Vu la grande similitude de la toxine du crabe, de la saxitoxine et de la tétródotoxine sur le plan des propriétés chimiques et pharmacologiques, on a tenté une autre comparaison en utilisant une préparation partiellement purifiée de toxine isolée de Z.aeneus (1.240 U.S./mg solide), un échantillon de saxitoxine à 97% obtenu auprès du Dr J.E. Campbell et de la tétródotoxine cristallisée fournie par la Sankyo Co.Ltd.

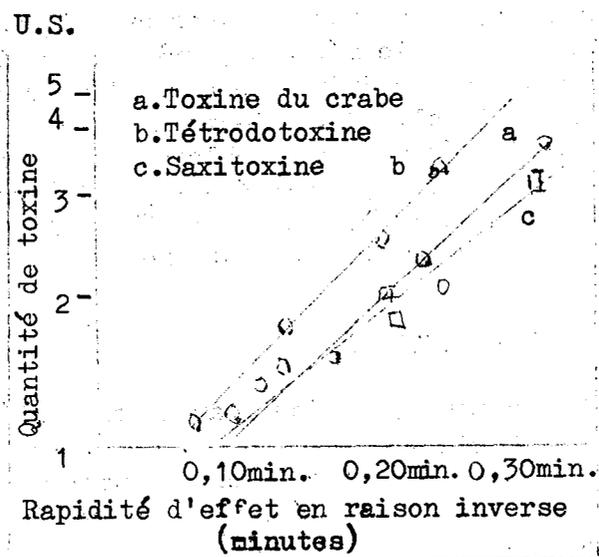


Fig.2 Rapport entre la dose et la rapidité d'effet

La toxine du crabe réagit de façon très semblable à la saxitoxine en chromatographie à la fois sur papier et en couche mince avec divers solvants, alors que la tétrodotoxine paraît donner des résultats différents.

D'autre part, la courbe dose/rapidité d'effet obtenue dans le cas de la toxine du crabe est pratiquement identique à celle de la saxitoxine, mais nettement différente de celle de la tétrodotoxine. Les rapports entre ces trois toxines apparaissent clairement dans la figure 2, qui indique les rapidités d'effet en raison inverse et les logarithmes des doses.

Discussion

Il est intéressant de noter que les trois crabes vénéneux cités dans cette étude appartiennent à la famille des Xantidés qui comprend aussi de nombreuses espèces inoffensives. Selon Banner et Randall (Atoll Research Bull., (13), ii + 62, 1952), un crabe toxique signalé aux îles Gilbert serait Z.aeneus. Cela donne à penser que l'espèce, très répandue dans la région indo-pacifique, serait toxique dans l'ensemble de sa zone de distribution.

En utilisant la méthode chromatographique à colonne d'échange d'ions, on a pu obtenir une préparation qui a servi à déterminer la dose mortelle minimale pour la souris, soit 0,028 y/g. Nous supposons donc que, après une purification aussi poussée que possible, la toxine du crabe aurait une toxicité presque comparable à celle de la saxitoxine (0,009 y/g) ou de la tétrodotoxine (0,008 y/g). Dans les tests auxquels nous l'avons soumise, elle ne se distingue pas de la saxitoxine; en revanche, elle apparaît nettement différente de la tétrodotoxine. En bref, on peut conclure que la toxine du crabe est identique à la saxitoxine, ou en est du moins très proche.

On a signalé de nombreux cas d'empoisonnements imputés à des crustacés vénéneux (B.W. Halstead: Poisonous and Venomous Marine Animals of the World, Vol.1, 905, 1965), mais il n'existe aucune donnée expérimentale sur la toxicologie, la pharmacologie et la chimie des toxines en cause, à l'exception cependant de la toxine paralysante qui a été isolée du crabe de sable Emerita analoga (H. Sommer et al.: Arch.Pathol., 24. 560, 1937). On pense que ce crabe devient toxicophore après ingestion d'une dinoflagellée vénéneuse, Gonyaulax. On a, en effet, pu établir une corrélation entre la présence de ce plancton et la toxicité du crustacé - d'ailleurs limitée au système digestif. Notre étude nous a permis de constater que la toxine est beaucoup plus abondante dans les appendices que dans le céphalothorax, et nous en avons trouvé une importante quantité dans l'exosquelette. En outre, aucune "marée rouge" n'a été signalée au moment où les crabes ont été récoltés. Cela tendrait à démontrer que la toxine du crabe, même si elle est identique à la saxitoxine, a une origine très différente.

Enfin, les caractéristiques pharmacologiques et chimiques de la ciguatérine et de la toxine des crabes que nous avons étudiés sont trop différentes pour accepter la croyance populaire qui attribue à ces crabes vénéneux l'origine de la toxine des poissons ciguatérigènes.

COMMISSION DU PACIFIQUE SUDSEMINAIRE SUR L'ICHTYOSARCOTOXISME

(Rangiroa, Polynésie Française, 16-22 août 1968)

RESUMELES CRABES TOXIQUES DES ILES RYŪ-KYŪ ET AMAMI
ET LES ANALOGIES ENTRE LA TOXINE DU CRABE ET LA SAXITOXINE

par Shoji Konosu et Yoshiro Hashimoto*

Nous avons fait l'étude rétrospective de dix-neuf cas d'empoisonnement par des crabes vénéneux dans les îles Ryū-Kyū et Amami. Le syndrome se caractérise par des vomissements, une paralysie et une évolution mortelle rapide. Lors d'une recherche systématique des crabes vénéneux, nous avons constaté que trois espèces, Zosimus aeneus, Platypodia granulosa et Atergatis floridus, contiennent une toxine paralysante qui tue les souris en quelques minutes. Les spécimens de A.floridus capturés sur la côte sud d'Honshū se sont également révélés vénéneux.

Il existe une variation individuelle marquée entre la toxicité de chacune des trois espèces étudiées. En général, les membres sont plus toxiques que le céphalothorax et l'exosquelette contient également une quantité considérable de toxine. Celle-ci est facilement dialysable, elle est soluble dans l'eau et le méthanol et insoluble dans la plupart des solvants gras.

La méthode chromatographique par colonne d'échange d'ions mise au point pour la saxitoxine peut être utilisée sans modification pour la purification de la toxine du crabe. On a obtenu à partir des extraits aqueux de Z.aeneus une préparation partiellement purifiée de toxine ayant une toxicité de 1.760 U.S./mg solide (la dose mortelle minimale pour les souris étant de 0,028 y/g de poids vif).

Sur le plan des résultats obtenus en chromatographie, à la fois sur papier et en couche mince, et du rapport entre la dose et la rapidité d'effet chez la souris. la toxine du crabe ne peut se distinguer de la saxitoxine; en revanche, elle diffère nettement de la tétrodotoxine. On peut conclure que la toxine du crabe est sans doute identique à la saxitoxine ou en est du moins très proche.

* Laboratoire de biochimie marine, Faculté d'agriculture,
Université de Tokyo.

1950

MEMORANDUM FOR THE RECORD

DATE: 10/15/50
SUBJECT: [Illegible]

TO: [Illegible]

FROM: [Illegible]

1. [Illegible text]

2. [Illegible text]

3. [Illegible text]

4. [Illegible text]

Very truly yours,
[Illegible Signature]

[Illegible Title]