

11 MAI 1978
INSTITUT DE RECHERCHES MEDICALES
LOUIS MALARDE

ETAT D'AVANCEMENT DES TRAVAUX

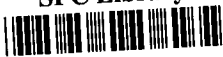
DE RECHERCHES SUR L'ICHTYOSARCOTOXISME DE TYPE CIGUATERA

(RAPPORT PROGRESSIF ETABLI POUR LA REUNION DU COMITE
D'EXPERTS EN ICHTYOSARCOTOXISME DE LA COMMISSION DU
PACIFIQUE SUD)

(22-25 MAI 1978 - PAPEETE)

Les travaux exposés dans ce rapport d'activité et les communications qui seront présentées à leur sujet rendent compte des principaux thèmes de recherche développés à l'Institut Malardé depuis la dernière réunion du Comité d'Experts.

Les chercheurs et techniciens qui ont participé à ces investigations sont les Docteurs R. BAGNIS, F. PARC et J.M. HURTEL, Mesdames E. CHUNGUE et S. CHANTEAU, Monsieur J.H. DROLLET, Mesdames S. THEVENIN, Melle M. GARCON, Messieurs M. GAY, R. PLICHART, C. HAMON, Mme M.F. MOREAU, Messieurs J. BENNETT et G. JACQUET.

SPC Library

33030
Bibliothèque CPS

LIBRARY
SOUTH PACIFIC COMMISSION

1 - ASPECTS EPIDEMIOLOGIQUES

La C.P.S. a enregistré 1 596 déclarations de cas d'ichtyosarcotoxisme en 1977, chiffre qui traduit une diminution de 22 % environ par rapport à l'année précédente. Tuvalu, la Nouvelle Calédonie, la Polynésie Française et les TTPI restent les territoires les plus exposés au risque ciguatérique parmi ceux qui notifient leur cas, avec des taux d'incidence officiels oscillant de 6 à 2,5 pour mille.

En Polynésie Française, l'endémicité ciguatérique semble en train de décroître légèrement, notamment dans les archipels des Gambier, des Marquises et certaines îles Tuamotu telles HAO. La situation reste stationnaire dans les autres archipels. Aucune nouvelle flambée notable n'a été enregistrée.

L'analyse des fiches reçues de Nouvelle Calédonie et de Tahiti en 1977 montre des différences significatives sur le plan des espèces ciguatérigènes. Aussi il apparaît qu'en Nouvelle Calédonie les trois familles les plus fréquemment incriminées sont les Serranidés, les Lutjanides et les Lethrinidés (respectivement responsables de 32,9 %, 18,6 % et 13,4 % des cas. A Tahiti les trois familles ayant provoqué le plus grand nombre d'intoxications ont été les Acanthuridés (30,2 %), les Scaridés (16,6 %) et les Carangidés (10,8 %), les Lutjanidés, Serranidés et Lethrinidés ne sont intervenus que dans respectivement 10,2 %, 9,6 % et 9,3 % des cas.

En ce qui concerne les données cliniques, les formes à type d'hypersensibilisation ont continué à progresser par rapport aux formes toxicologiques pures dans les archipels des Marquises, des Gambier et à Hao.

2 - ASPECTS ECOLOGIQUES

Les investigations les plus significatives ont été réalisées à Hitiaa et Papeete (Tahiti). Mais des données ponctuelles ont pu être aussi obtenues concernant diverses autres stations de Tahiti, Moorea, des Gambier et de Hao.

2.1. Etude dynamique de deux populations de Dinoflagellés potentiellement toxiques à Hitiaa

= Le récif de Hitiaa est situé sur la côte Est de Tahiti vers le PK. 36. Il s'agit d'un récif frangeant ordinaire pour une île haute de Polynésie Française, particulièrement exposé aux vents dominants. A cause de la force de la mer beaucoup de sédiments sont remis fréquemment en suspension créant de mauvaises conditions de vie pour certaines espèces coralliennes fragiles. La couverture du platier en coraux vivants est néanmoins assurée à 80 % environ par des encroutements d'Acropora, Montipora, Pocillopora principalement. Dans les interstices coralliens prolifèrent des bouquets d'algues vertes Turbinaria ornata associés par place à quelques touffes d'algues rouges et vertes. La crête algale est basse et présente un bon recouvrement en Lithothamnées. Elle dessine une frange où altèrent de classiques éperons et sillons. Au pied de la crête, on trouve de petits buissons de Jania et d'Holimeda.

= Des études antérieures ayant montré que les T. ornata constituaient de bons pièges à Dinoflagellés, nous avons appliqué pour notre étude la méthode de comptage, mise au point par Yasumoto et coll. (1). Au sein de 10 bouquets de turbinaires de tailles variées répartis sur une surface de récif d'environ 10 m², nous prélevons une feuille de la partie supérieure. Les 10 feuilles recueillies sont agitées au Voortex dans 10 ml d'eau de mer. Le liquide de mixage est centrifugé. On conserve le culot dans 0,5 ml. On compte les Dip G. présents dans deux gouttes de culot préalablement remis en suspension.

= L'étude a été effectuée au niveau des 6 stations établies en décembre 1976 par Yasumoto et Inoue au niveau du sommet de la crête algale. Les prélèvements sont hebdomadaires jusqu'à la mi-mars 1977 nous avons centré

nos comptages sur Diplopsalis (Dip G). Mais étant donné son association fréquente à un autre péridinien de taille et structure voisines (désigné par le signe Per H et identifié depuis comme Ostreopsis siamensis par Adachi et Fukuyo), nous avons ensuite procédé à la numération hebdomadaire à la fois de Dip G et Per H. A partir de la même période nous avons également pris la température de l'eau de mer et effectué des dosages réguliers de salinité et sels nutritifs. Nous avons aussi, à l'occasion, recherché la présence de péridiniens parmi d'autres algues ou au sein des amas biodétritiques recouvrant les galets coralliens.

= Les résultats obtenus, partiellement illustrés par les figures 1 et 2, sont énoncés et discutés ci-après.

A)- Les populations de Dip G relativement abondantes sur le récif d'Hitiaa, notamment entre les stations 2b à 5b au cours des 3 premiers mois de l'année 1977 (avec une densité maximale au niveau de la station 4b) se sont soudain amenuisées en aval pour devenir absolument incomptables dès le mois de mai. Depuis cette date, aucun Dip G n'a pu être recensé par la méthode de comptage utilisée. Episodiquement quelques rares spécimens ont pu être observés dans l'eau de mer recueillie au fond des sacs de plastique ayant servi au transport.

B)- Absent de T. ornata, Dip G n'a également jamais pu être compté sur les autres substrats algaux, ni parmi les recouvrements biologiques des galets coralliens prélevés au pied de la crête algale à partir de mai 1977.

C)- Pendant les mois de mars et avril, quand Dip G était encore comptable sur le récif, les turbinaires constituaient indiscutablement le meilleur piège pour ces péridiniens. Il n'a jamais pu en être observé en abondance comparable sur les algues calcaires ou filamenteuses testées qu'elles soient collectées en surface ou entre 2 et 5 m de profondeur.

D)- Au cours du mois de mai 1977, on a pu également enregistrer une baisse des peuplements de Per H. Mais cette espèce n'a jamais vraiment disparu. Par ailleurs, à partir d'Octobre, un accroissement de la population moyenne mensuelle s'est produit au niveau de chacune des stations, suivi d'une nouvelle chute en janvier 1978 avec état stationnaire depuis cette date.

Populations moyennes mensuelles de Dip.G dans les 6 stations de prélèvement d'Hitiaa de décembre 1976 à avril 1978.

	Dip G
1 b	x x x x
2 b	
3 b	-----
4 b	=====
5 b	~~~~~
6 b	

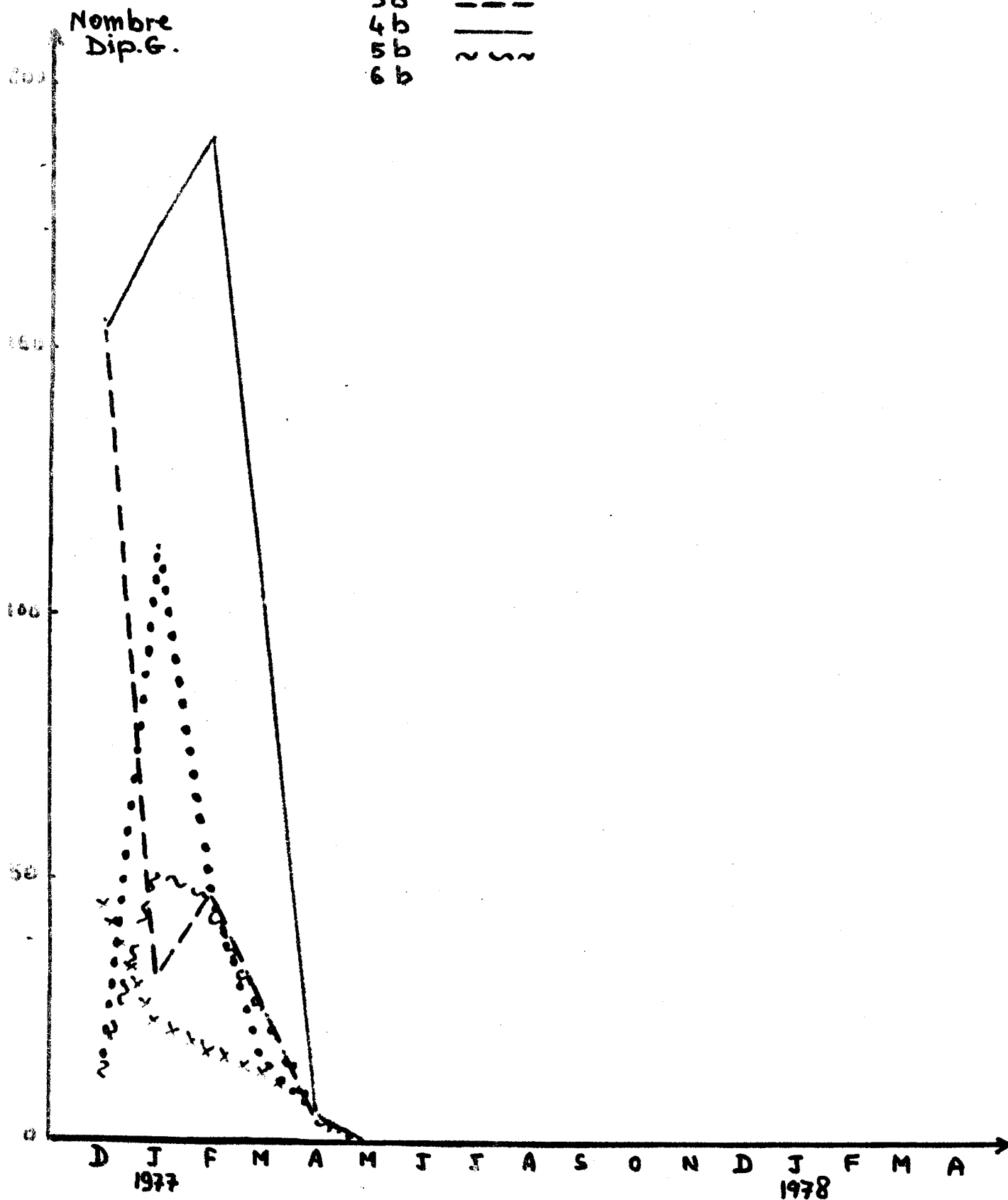


Figure 1

Populations moyennes mensuelles de Per. H dans les 6 stations de prélèvement d'Hitiaz de décembre 1976 à avril 1978

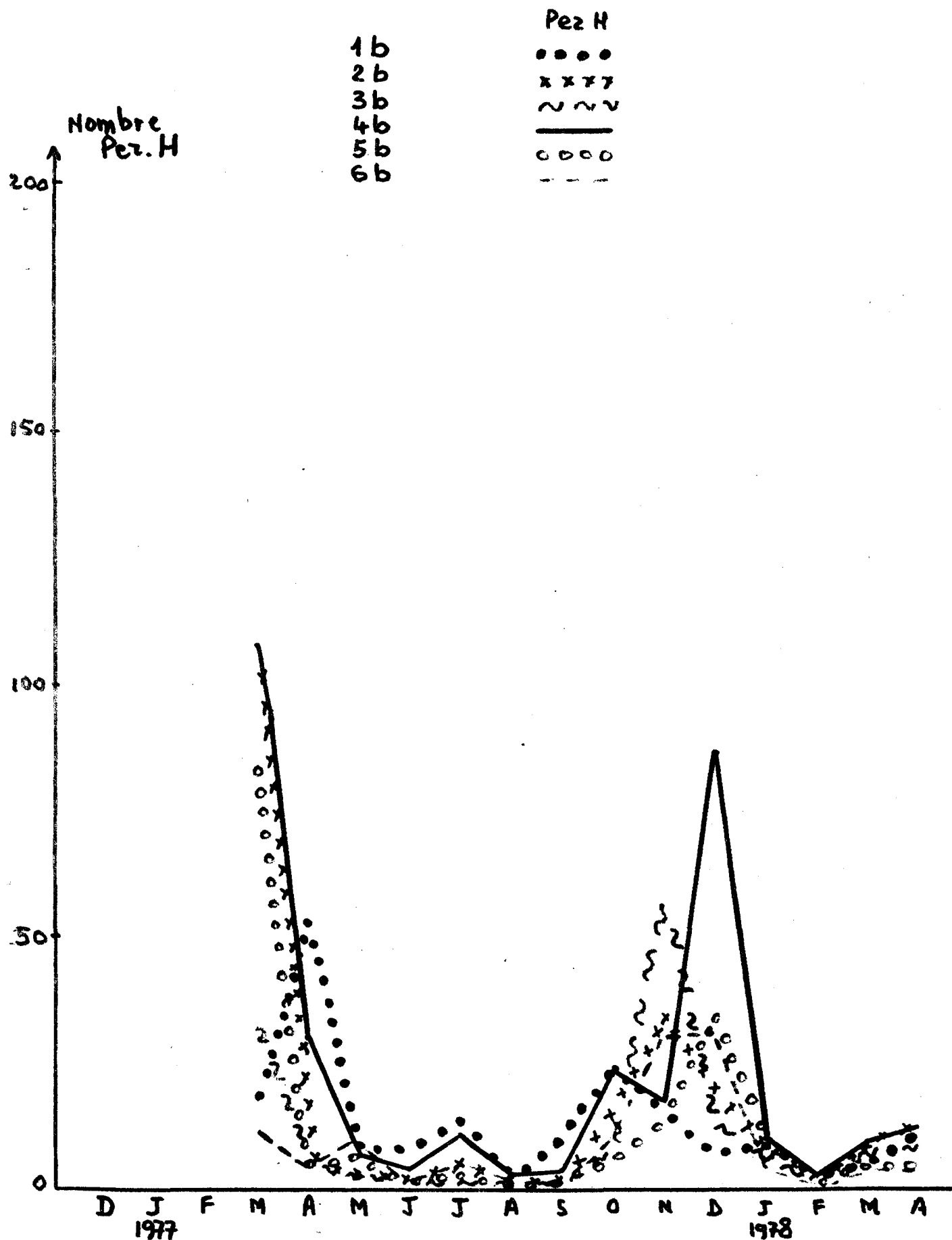


Figure 1

E)- Une 3ème population de péridiniens, de taille nettement inférieure (30 u de moyenne) a été notée fréquemment associée à Per H et Dip G. L'espèce en question morphologiquement très proche de Per H a été désignée par le sigle Per H₂. Elle n'a pu être comptée, mais sa densité suivait approximativement celle de Per H.

F)- Au cours de nos observations microscopiques nous avons également relevé que les populations de diatomées suivent grossièrement l'évolution quantitative des Dinoflagellés.

G)- Enfin il est digne d'être noté qu'à la suite d'une période de très basse mer ayant laissé la partie supérieure du platier émergée pendant plusieurs jours en janvier 1978, les peuplements T. Ornata sur le récif d'Hitiaa ont nettement diminué.

H)- Jusqu'à présent les données physiochimiques recueillies n'ont pu être reliées de façon quelconque à la dynamique des peuplements de Dinoflagellés. Les chiffres extrêmes enregistrés ont été indiqués dans le tableau ci-dessous.

Température (d°C)	Salinité (ClNa ‰)	Phosphates (atg P/l)	Silicates (atg Si/l)	Nitrates (alg N/l)	Nitrites (atg N/l)
24,5 - 29,8	34,31 - 36,22	0,04-1,55	0,12-1,30	0,00-0,23	0,00 - 1,64

2.2. Distribution des Dinoflagellés potentiellement toxicophores

2.2.1. Données relatives à Tahiti et Moorea

Cette étude a été réalisée de façon quantitative sur T. ornata (suivant la méthode précédemment décrite) ainsi que sur diverses autres algues filamenteuses (suivant une méthode identique mais à partir de 3 g de matériel). On procède aussi à la prospection de l'eau de mer accompagnant les prélèvements.

Les prélèvements ont été effectués à Tahiti en mai-juin 1977 septembre-octobre 1977 et avril 1978 ; à Moorea en mai et août 1977, les stations ont été établies aussi bien sur les récifs barrières que frangeantes,

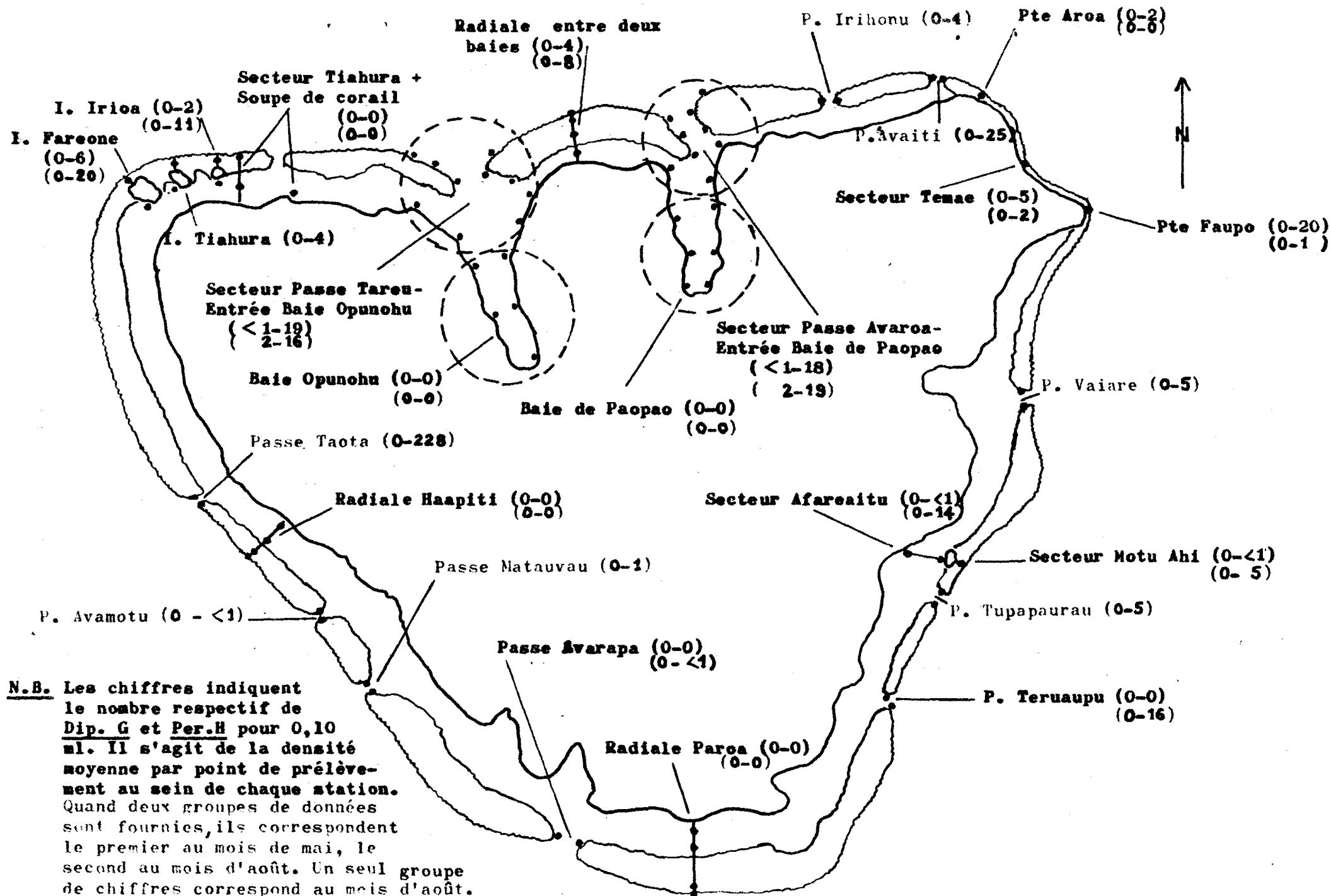
dans les passes et dans les baies. Les diverses stations (qui comprennent parfois plusieurs points de prélèvement) et les résultats significatifs sont indiqués sur les figures 3 et 4.

L'analyse de l'ensemble des données recueillies révèle tant à Tahiti qu'à Moorea, d'une part une faible densité d'ensemble de Dinoflagellés benthiques (à l'exclusion par places de certains Per H2 et Exuviaella), d'autre part la rareté de Dip G. Par contre Per H. sans jamais atteindre une concentration de 1000/ml par point de prélèvement (à une exception près) paraît l'espèce la plus largement distribuée.

a/- A Moorea, les quelques Dip G. que nous avons identifiés, se trouvent dans les passes. Pareu et Avaroa. Quant à Per H. on le rencontre dans les passes, sur les récifs barrières et frangeants. Mais il est totalement absent de la partie interne des deux grandes baies de Paopao et Opunohu, de même que le long des radiales établies sur les côtes Ouest et Sud. Sa localisation préférentielle se situe sur les côtes Nord et Est. C'est notamment sur la côte Nord, au niveau des passes de Pareu et Avaroa, des entrées des baies de Paopao et Opunohu, à la pointe Faupo que se trouvent les plus fortes densités de Per H. Il est cependant difficile de définir au sein des écosystèmes concernés, les biotopes apparemment les plus favorables au développement abondant de ce Dinoflagellé.

b/- A Tahiti, Dip G. a été pratiquement incomptable aux périodes de l'année testées. Les quelques individus isolés ont été observés dans des prélèvements en provenance de la côte Est de l'île et de la côte Ouest de la presqu'île de Taiarapu. Leur nombre est négligeable. Par contre Per H. a été trouvé en quantité légèrement plus importante dans plusieurs stations de la presqu'île de Taiarapu ainsi qu'aux confins de Hitiia-Mahaena. Il s'agit entièrement de prélèvements effectués sur des récifs barrières plus ou moins immergés à marée basse. Les prélèvements effectués sur les récifs frangeants sont beaucoup plus pauvres.

c/- Dans une seule station, nous avons trouvé des chiffres de Per H. supérieures à 1000/ml, pour un point de prélèvement. Il s'agit de la berge Est de la passe de Papeete. Une première observation faite le 17 juin 1977 nous avait révélé en deux points de récif (référence MU 2 et MU 3), des concentrations atteignant respectivement 2520 cellules/ml et 1480 cellules/ml. Aussi avons-nous étudié la dynamique de cette population en six points de la station. Les résultats relatifs à MU 2 et MU 3, points distants d'environ 30 mètres sont inscrits sur la figure 5. On peut remarquer que la densité de ces microorganismes est très fluctuante, la représentation graphique tendant vers une sinusoïde de fréquence et amplitude



N.B. Les chiffres indiquent le nombre respectif de Dip. G et Per. H pour 0,10 ml. Il s'agit de la densité moyenne par point de prélèvement au sein de chaque station. Quand deux groupes de données sont fournis, ils correspondent le premier au mois de mai, le second au mois d'août. Un seul groupe de chiffres correspond au mois d'août.

FIGURE 4 - Distribution respective des Dinoflagellés Dip. G et Per. H dans différentes zones de Moorea en Mai 1977. et Août 1977.

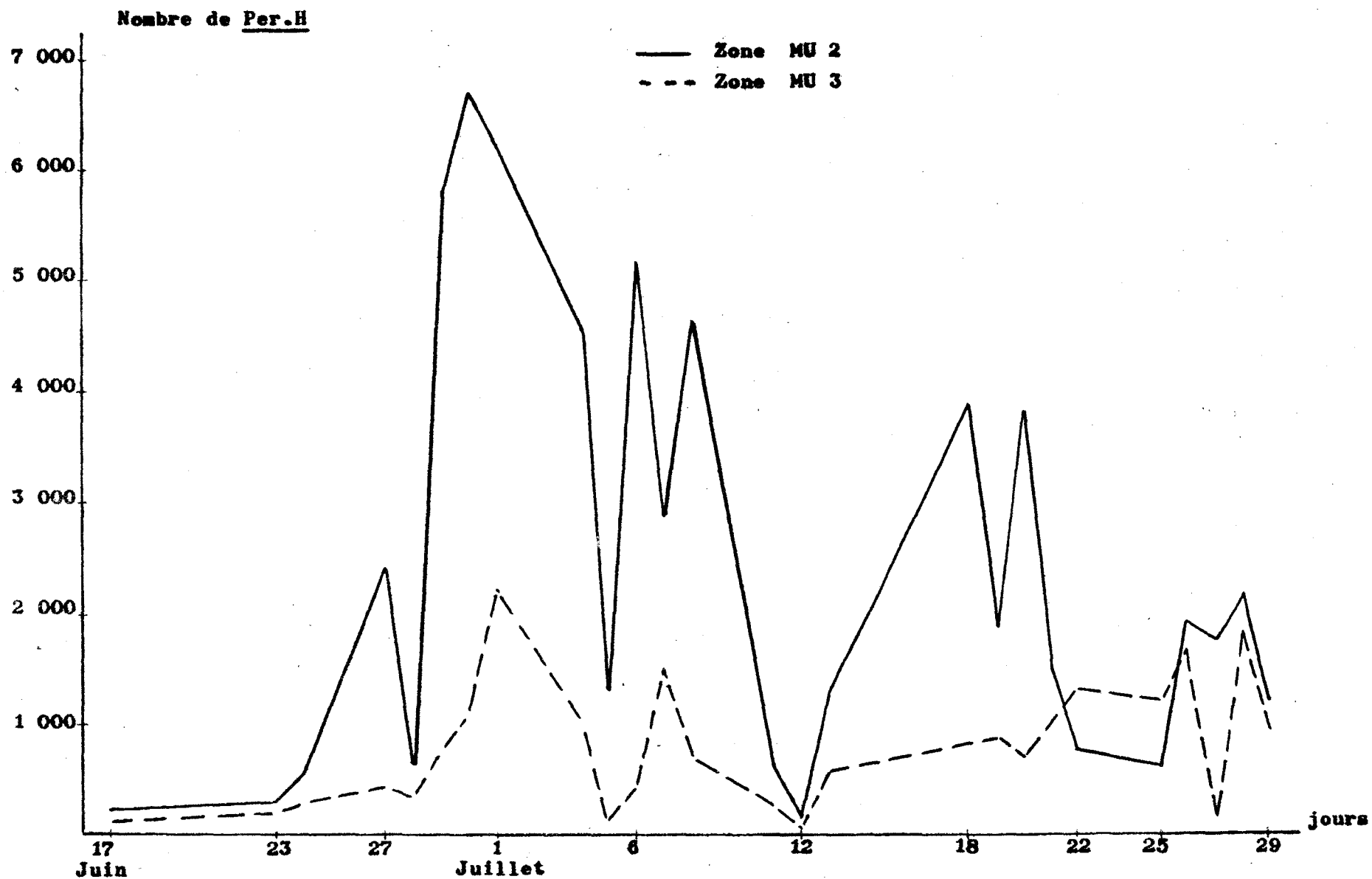


FIGURE 5 - Evolution des populations de Dinoflagellés Per.H dans deux stations de la passe de Papeete en Juin-Juillet 1977.

variable. Quant à l'évolution des peuplements sur près d'une année, elle est marquée par une nette recrudescence apparente de juin à octobre 1977 (figure 6).

2.2.2. Données relatives aux Iles Gambier

L'absence de T. ornata aux îles Gambier nous a amené à rechercher une autre espèce assez uniformément reportée et constituant un bon piège à Dinoflagellés. A la lumière des investigations effectuées par Inoue en janvier 1977 nous avons choisi des algues rouges Corallina qui ont été prélevées dans 10 stations inscrites sur la figure 7.

Les données récapitulées dans le tableau I font apparaître :

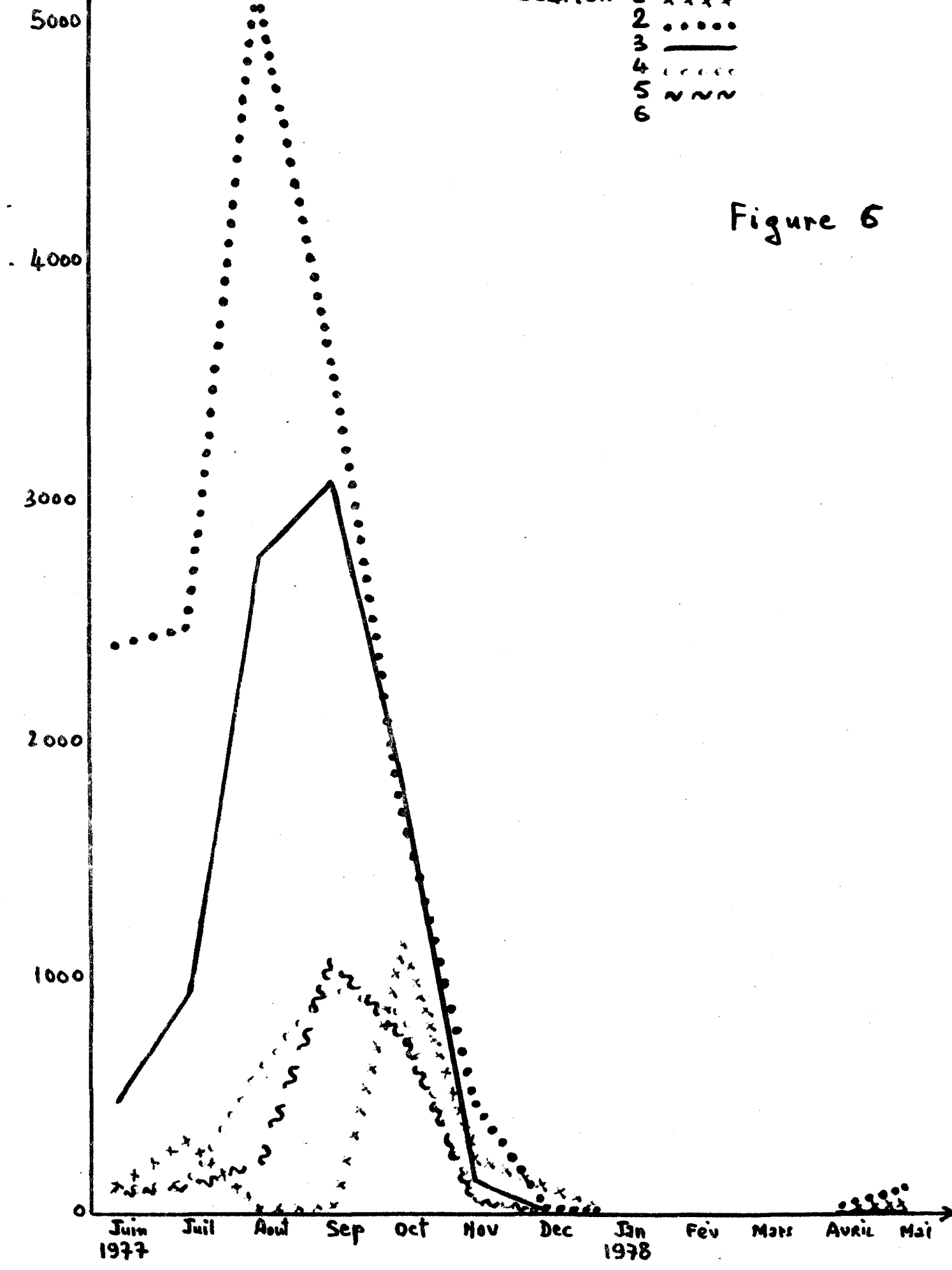
- des chiffres de population de Dip G incomparablement supérieurs dans l'ensemble à ceux enregistrés partout ailleurs à Tahiti, Moorea et Hao.
- des variations importantes d'une station à l'autre au cours d'une même prospection.
- des fluctuations au niveau de certaines stations qui ne paraissent pas revêtir un caractère cyclique superposable aux saisons.
- une certaine homogénéité des densités de peuplement au niveau des stations de la bordure Est de Taravaï, zone d'endémicité ciguatérique actuellement très élevée.

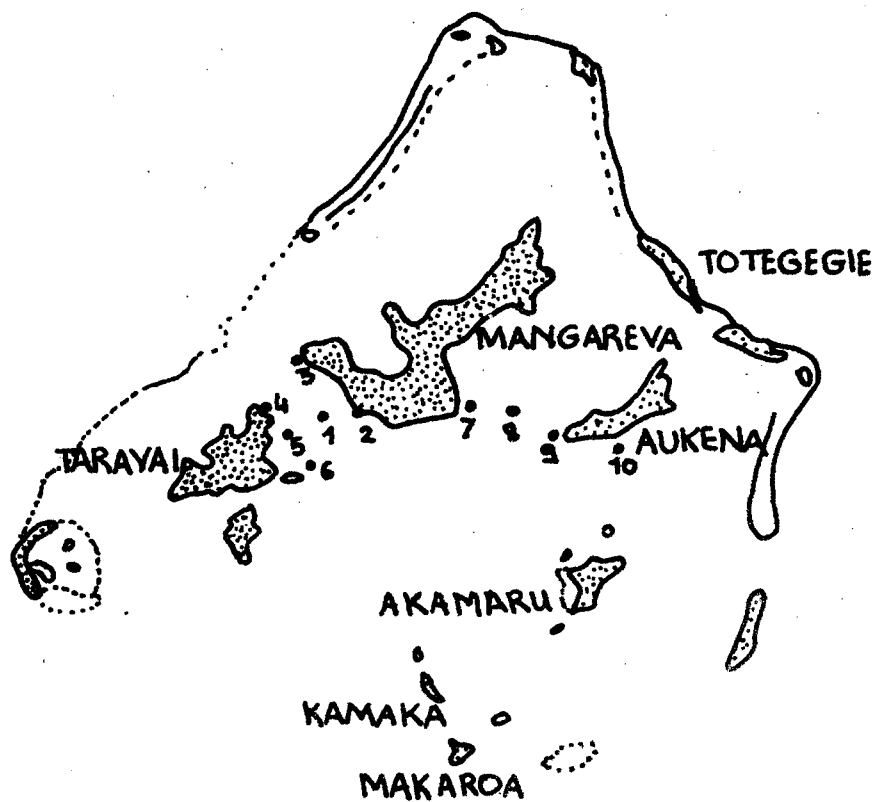
Nombre
Pez H.

Populations moyennes mensuelles de *pez. H.* dans
six stations de prélèvement de la berge est de
la passe de Papeete (récif de Motu-Uta)

Station 1 x x x x
2
3 ———
4 ~ ~ ~ ~
5 ~ ~ ~
6

Figure 6





CARTE DES ILES GAMBIERS
SITUATION DES STATIONS DE PRELEVEMENT

Figure 7

TABLEAU I - Distribution comparée des peuplements de Dip G. dans 10
 ----- stations des Iles Gambier en janvier 1977 (A), novembre 1977
 (B) et janvier 1978 (C) au niveau des algues calcaires rouges
 Corallina.

<u>Station</u>	<u>Nombre de Dip G. par échantillon</u>		
	A *	B	C
1	715	180	100
2	165	20	140
3	1	0	60
4	1	12 440	13 080
5	4	23 500	13 480
6	32	37 200	21 200
7	1	220	1 020
8	8	1 560	5 800
9	4 920	20	480
10	724	490	4 640

* Données recueillies par Inoue.

2.2.3. Données relatives à Hao

Elles datent de la fin avril 1978 et ont donc un caractère préliminaire. L'absence de turbinaires sur les atolls en général et d'excroissances algales d'autres espèces (Corallina, Holimeda) au niveau de la passe Kaki n'a pas permis une étude quantitative sur un substrat algal bien individualisé dans cette partie de l'île. En revanche, dans plusieurs autres secteurs, nous avons pu explorer la densité de Dip G. au niveau d'échantillon de Jania, Dictyota, Codium et Galaxaura. Dans la passe Kaki la prospection a été effectuée sur des recouvrements biologiques de galets coralliens.

Les diverses observations qualitatives font ressortir la présence de quelques rares Dip G dans la partie interne de la passe ainsi qu'à proximité du village. Une densité de péridiniens légèrement supérieure a été notée à l'extérieur de la passe. Mais elle n'a jamais excédé 6 individus par échantillon observé, (se situant plus souvent aux environs de 2 à 3 cellules). Il nous faudra cependant multiplier les observations sur le matériel rapporté pour savoir si cette faible densité en Dip G. laisse présager la fin prochaine de la flambée ciguatérique. Un certain nombre de données épidémiologiques et cliniques le font supposer.

140° O

ECHELLE
1/230 000

50.

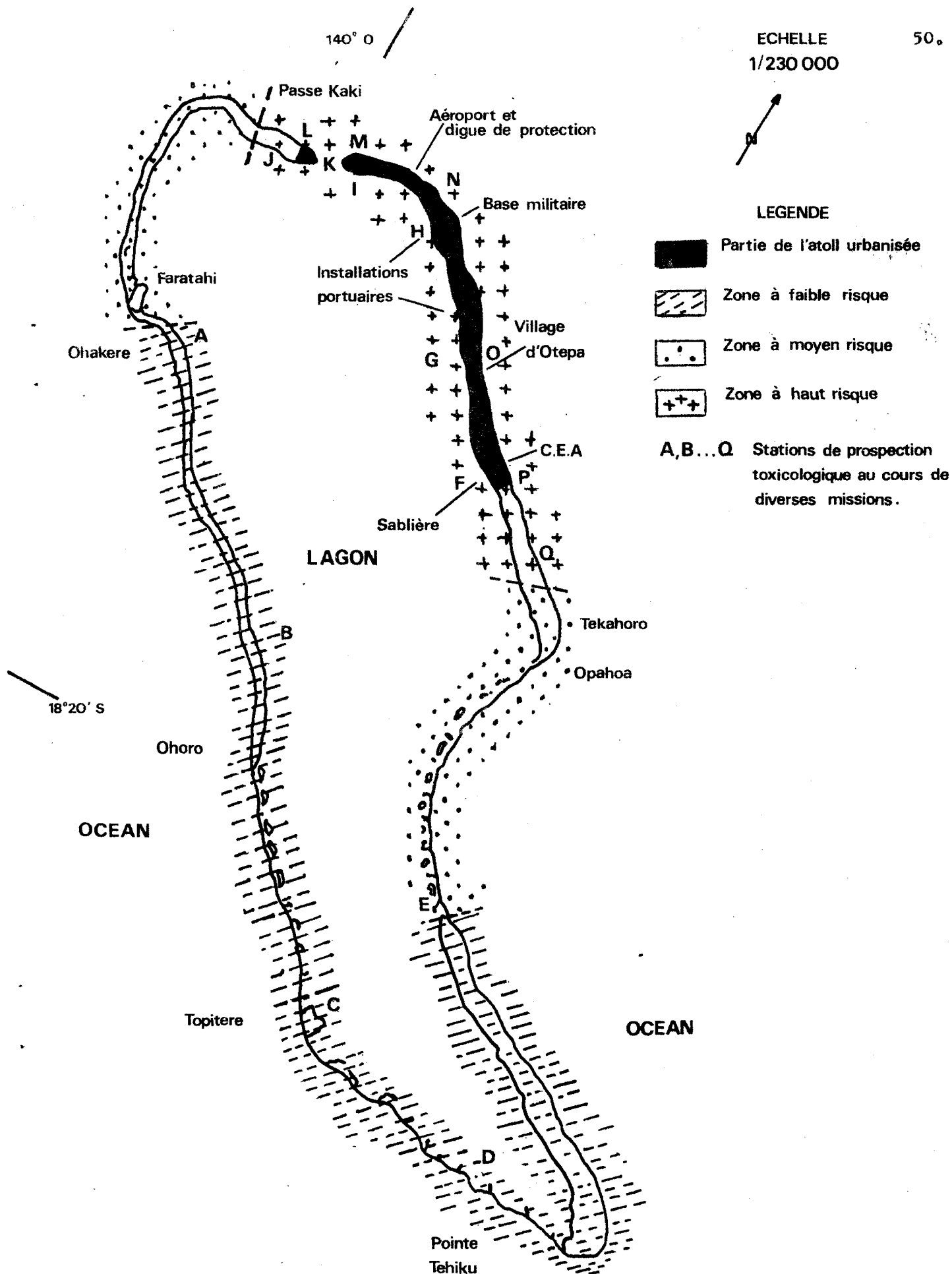


FIGURE 8 : Distribution schématique du risque ciguatérique à HAO en 1976 en fonction de l'évolution de la morbidité ciguatérique et de la ciguatoxicité des poissons microphages depuis 1967.

3 - ASPECTS BIOCHIMIQUES

Nos activités sont divisées en deux parties. L'une concerne la préparation des toxines purifiées aux fins d'études pharmacologiques et immunologiques. L'autre est consacrée à l'étude toxicologique et biochimique des toxines extraites de diverses algues de culture.

3.1. Purification de diverses toxines

Le tableau 2 rassemble les caractéristiques de diverses toxines ciguatériques purifiées selon les méthodes habituelles. Leur utilisation a été partagée entre l'Université de Hawaï et l'Institut Malardé.

3.2. Etude toxicologique et biochimique des toxines extraites de diverses algues de culture.

Il s'agit d'organismes cultivés de façon monoalgale et non mixotrophe. Chaque culture a été filtrée. Les résidus sont ensuite extraits par le méthanol bouillant.

Les résultats d'extraction sont consignés dans le tableau 3.

La plupart des extraits se sont avérés atoxiques ou faiblement toxiques sauf les cultures N° 1; 9; 11; 13; 14 et 15. La symptomatologie souris consécutive à l'injection des fractions hydrosolubles précipitables à l'acétone est semblable à celle induite par la maïtotoxine (MTX).

Par contre la symptomatologie souris provoquée par les fractions liposolubles est différente de celle des toxines ciguatériques liposolubles (ciguatoxine et scaritoxine) sauf pour la culture de Diplopsalis (N° 14).

Nous avons étudié le comportement chromatographique des fractions hydrosolubles précipitables à l'acétone et liposolubles des cultures de Amphidinium I (N° 1), Diplopsalis (N° 11, 13 et 14) et Exuviellaa (N° 15).

TABLEAU 2 - LISTE DES EXTRAITS TOXIQUES PARTIELLEMENT ET TRES
PURIFIES.

EXTRAITS	POIDS mg.	DLM ug/gs	TOXICITE TO- TALE US.	UTILISATEURS
SG ₁	5,2 0,85	0,2 0,2	26 000 4 250	{ Dr. RAYNER 2250US Dr. HOKAMA 2000US
SG ₂	3 0,14	0,4 0,08	7 000 1 750	{ Dr RAYNER 1000US Dr. HOKAMA 750US
CTX Tonu	0,7	0,07	10 000	Mme CHANTEAU
CTX Tonu	12,8	0,94	13 600	
CTX Tonu	86,1	26	3 200	
CTX Hapuu	0,2	0,006	31 920	
CTX Murène	0,1	0,008	12 000	Dr BERGER 1000 US
CTX Haamea	81,8	7,1	11 500	
CTX Coraux	3,6	0,32	11 000	
"	4,8	0,45	10 500	
"	2,7	0,17	15 000	Mme CHUNGUE
MTX Coraux	28,7	0,47	60 000	
"	42	7,4	5 600	
"	190	10	19 000	
"	0,8	0,2	4 000	
"	327,4	4,6	70 000	
"	15	1,5	10 000	Dr RAYNER 5000 US Dr HOKAMA 5000 US

TABLEAU 3 : TOXICITE DES DIVERSES ALGUES DE CULTURE

N°	ESPECE	FRACTION LIPO- SOLUBLE	FRACTION HYDROSOLU- BLE	
			Précipité "acétone	Résidu acétone soluble
1	Amphidinium I $1,2 \times 10^6$	180 US	230 US	Atoxique
2	Amphidinium III 350×10^6	Atoxique	190 US	Atoxique
3	Per. minusculum 80×10^6	"	Atoxique	"
4	Per. H. $9,2 \times 10^6$	200 US	"	"
5	Per. H. 9×10^6	250 US	"	"
6	Per. H. 45×10^6	Atoxique	30 US	"
7	Cryptomonas $2,4 \times 10^9$	"	Atoxique	"
8	Chrysophycées I 2 l de culture	"	30 US	"
9	Chrysophycées II 2 l de culture	1520 US	45 US	"
10	Isochrysophycées $1,5 \times 10^9$	20 US	Atoxique	"
11	Diplopsalis (petits) $6,4 \times 10^6$	200 US	7500 US	"
12	Diplopsalis (petits) 28×10^6	1000 US	750 US	"
13	Diplopsalis (gros) 750×10^3	150 US	8000 US	"

14	Diplopsalis (gros) 820 x 10 ⁵	1600 US	" 3820 US	"
15	Exuviella 200 x 10 ⁶	2000 US	" 930 US	"
			"	
			"	
			"	
			"	
			"	

3.2.1. Comportement chromatographique des fractions hydrosolubles précipitables à l'acétone de diverses algues de culture

Les résultats sont consignés dans le tableau 4. Le comportement de la maïtotoxine (MTX) témoin est également décrit.

TABEAU 4 - Comportement chromatographique et symptomatologie souris de chacune des fractions hydrosolubles précipitables à l'acétone extraites de diverses algues de culture.

ESPECE	COLONNE S. O ₂ Fractions toxiques	Symptomatologie souris
Témoin		
MTX	C/M : 6/4 C/M : 4/6 (1/1)	perte d'activité générale, cyanose, mort
Amphidinium I (N° 1)	C/M : 1/1 L/M : 0/1	id id
Diplopsalis (* *) (N° 11)	C/M : 6/4	id
Diplopsalis (*) (N° 13)	C/M : 1/1	id
Diplopsalis (* *) (N° 14)	(***)	id
Exuviella (N° 15)	(***)	id

* Diplopsalis de petite taille, 11 Diplopsalis de grande taille
MTX : maïtotoxine, C : chloroforme, M : méthanol, (***) en cours.

3.2.2. Comportement chromatographique des fractions liposolubles de diverses algues de culture

Les résultats sont consignés dans le tableau 5. Le comportement des toxines "témoin" est également décrit.

TABLEAU 5 - Comportement chromatographique et symptomatologie souris de chacune des fractions liposolubles extraites de diverses algues de culture.

ESPECE	COLONNE SiO ₂	Symptomatologie souris	CCM	COLONNE DEAE
Témoins :				
CTX (murène)	C/M : 9/1	(diarrhée, dysp (née, convul-	0-0,3	C/M : 1/1
SG ₁ (perroquet)	C/M : 9/1	(sions et mort	0,5-0,7	C/M : 1/0
Amphidinium I (N° 1)	C/M : 9/1	perte d'acti- vité, cyanose mort		
Diplopsalis ** (N° 11)	non faite : épuisée	id		
Diplopsalis * (N° 13)	C/M : 0/1	id		
Diplopsalis ** (N° 14)	C/M : 1/0 C/M : 9/1	(id à CTX (ou SG ₁	0,57-0,7 0,28- 0,46	C/M : 1/0 C/M : 1/0
Exuviella (N° 15)	C/M : 9/1	perte d'acti- vité, cyanose mort		

* : Diplopsalis de petite taille, ** Diplopsalis de grande taille
C : chloroforme, M : méthanol, CTX : ciguatoxine, SG₁ : Scaratoxine
CCM : Chromatographie sur plaque de silicagel (solvant: Benzène/
Butanol

3.2.3. Discussion

Le comportement chromatographique et la symptomatologie souris des fractions hydrosolubles précipitables à l'acétone provenant des diverses algues toxiques de culture sont semblables à ceux montrés par la maïtotoxine. Cette dernière serait donc commune à diverses algues.

Par contre seule la fraction liposoluble provenant des *Diplopsalis* de culture N° 14 renferme des toxines de type ciguatoxique. L'une est identique à la scaritoxine par son comportement chromatographique et sa symptomatologie souris. L'autre est semblable à la ciguatoxine et à la scaritoxine par son action sur la souris mais légèrement différente par son comportement chromatographique. Comme la scaritoxine, elle est éluée d'une colonne de DEAE (OH) par le chloroforme. Mais les valeurs des Rf. de la "bande toxique" se situent entre 0,28 et 0,46 tandis que celles de la scaritoxine sont de 0,5-0,7 et celles de la ciguatoxine de 0-0,3 dans les mêmes conditions opératoires.

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus à partir de certains recouvrements biologiques de galets coralliens. Ils soulèvent à nouveau le problème des relations chimiques existant entre ciguatoxine et scaritoxine, en particulier celui de leur convertibilité réciproque et des formes intermédiaires qui seraient intimement liées aux facteurs d'ambiance.

3.3. DISTRIBUTION DE LA CIGUATOXICITE SUR DIFFERENTS ECHANTILLONS DE GALETS CORALLIENS ET ALGUES.

3.3.1. Toxicité des débris madréporiques et des algues rouges des Iles Gambier en extraction totale.

Les coraux morts recouverts d'algues mixtes sont grattés avec une brosse et les débris obtenus sont extraits au méthanol à chaud, après comptage de la population de *Diplopsalis*.

Les algues calcaires rouges (*Jania*, *Corallina*) sont soigneusement lavées à l'eau de mer filtrée pour en recueillir toutes les matières fixées qui sont ensuite extraites après comptage des *Diplopsalis*.

Les résultats obtenus pour la maitotoxine (MTX) et la ciguatoxine (CTX) dans les divers prélèvements, sont représentés par la figure 9.

- au niveau des coraux morts, nous observons une bonne proportionnalité entre le nombre de *Diplopsalis* et la quantité de MTX et CTX trouvée.
- par contre au niveau des algues rouges, il n'existe aucune relation de proportionnalité. Un échantillon contenant 15 millions de Dip.G produit 1 000 US de CTX et 50 000 US de MTX, alors qu'un autre contenant 160 000 Dp donne 500 US de CTX et 200 000 US de MTX. Dans ce dernier prélèvement, nous avons noté son aspect très boueux et une grande quantité d'amas de bactéries.

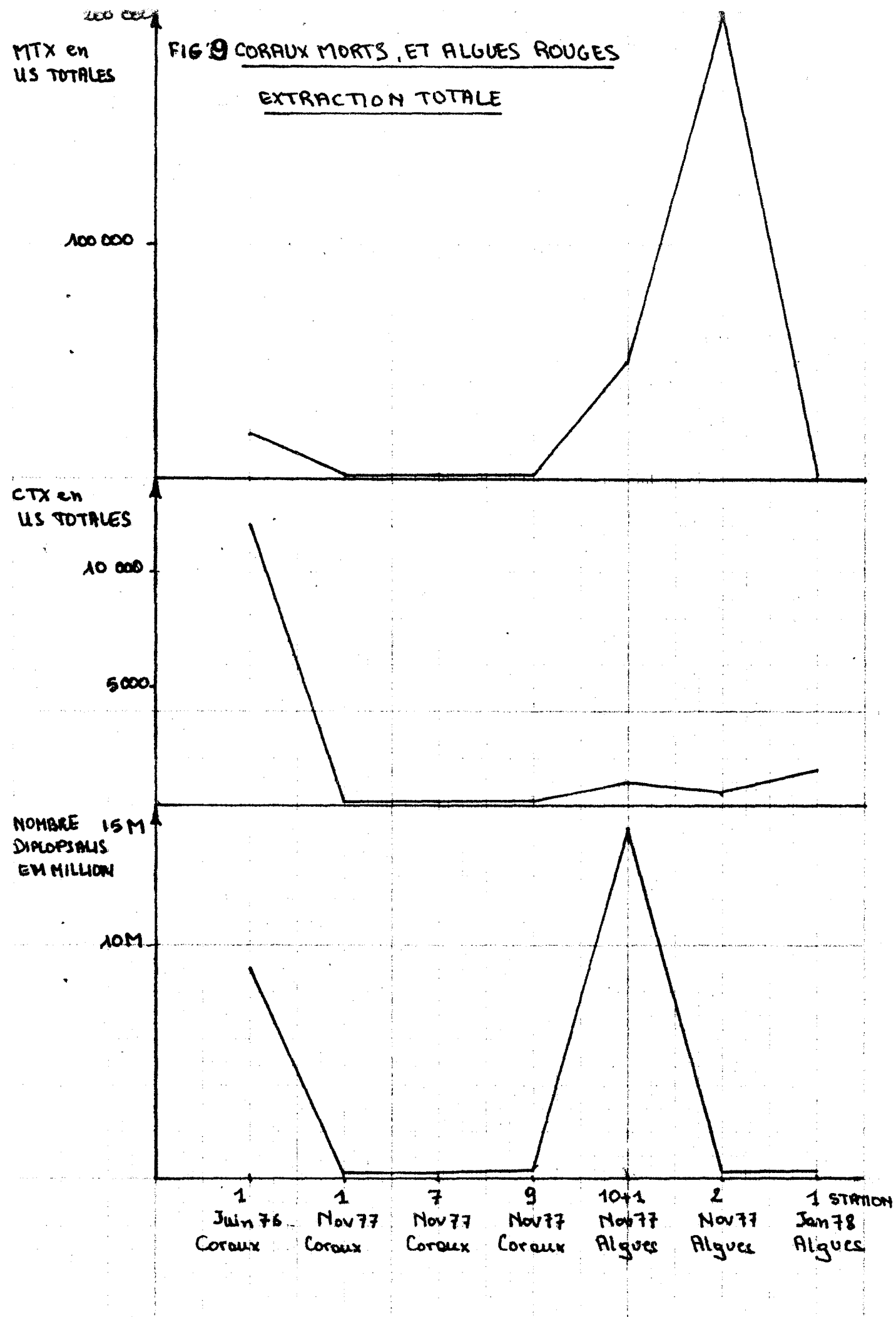
3.3.2. Répartition des toxines après fractionnement par tamisage des coraux morts et des algues rouges des Iles Gambier.

Quatre expérimentations de tamisage ont été réalisées dont trois sur les recouvrements biologiques coralliens et une sur les algues rouges (*Jania*, *Corallina*). Ce sont des prélèvements de Mai 1974 (déjà exposé lors de la réunion C.P.S. 1977), Juin 1976, Novembre 1977, et Janvier 1978. Leurs toxicités sont représentées par les figures 10, 11, 12 et 13. De l'analyse de ces diverses figures, il ressort un certain nombre de faits intéressants :

./...

FIG 9 CORAUX MORTS, ET ALGUES ROUGES

EXTRACTION TOTALE



MTX en
US TOTALES

FIG 10. CORAUX MORTS M. 71 1967

200.000

CTX en US
TOTALES

150 000

100 000

50 000

NOMBRE 150 M
DIPLODIPLOIS
EN MILLION

100 M

50 M

I
Coraux "nus"

II
2,5 mm

III
500 μ

IV
100 μ

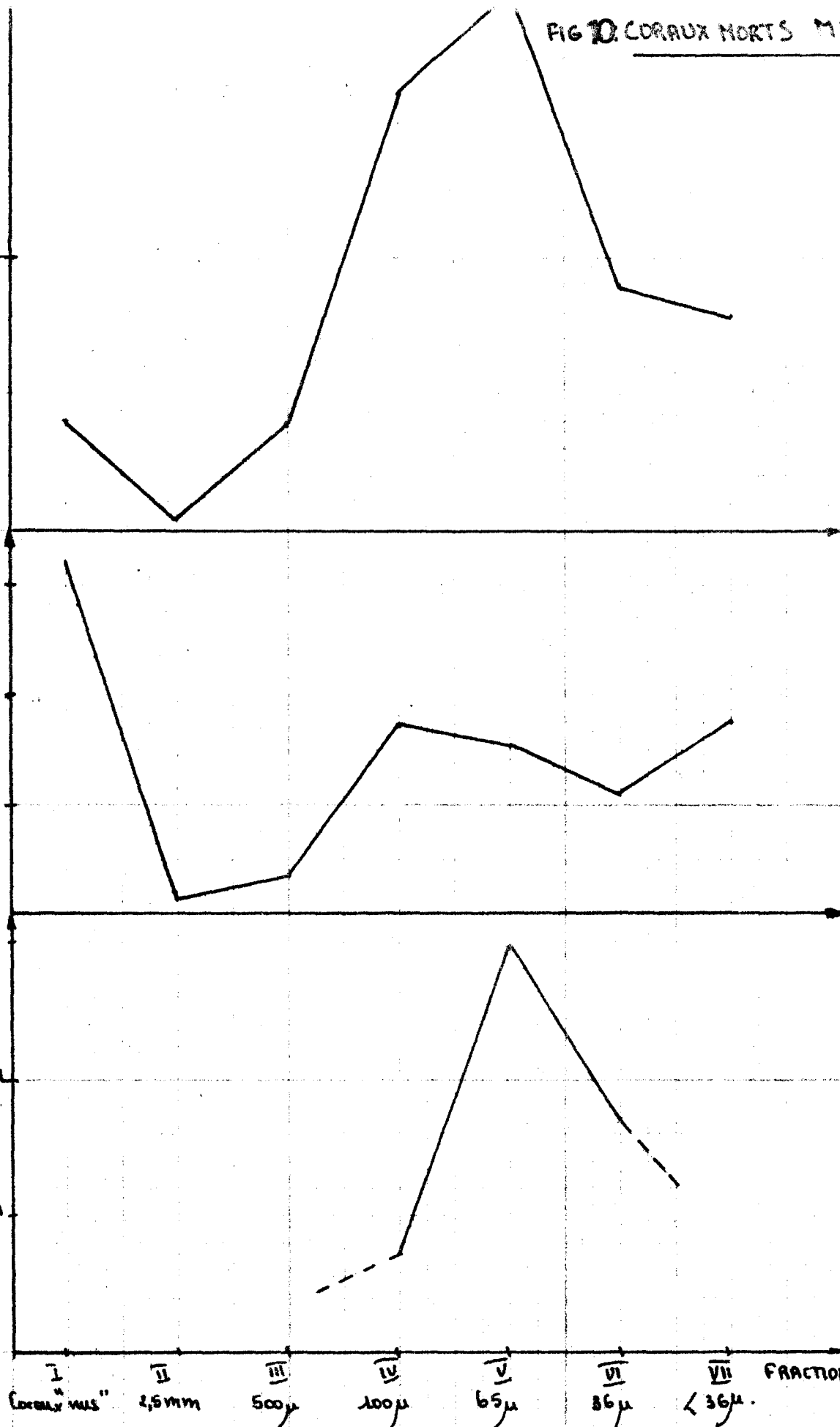
V
65 μ

VI
36 μ

VII
< 36 μ

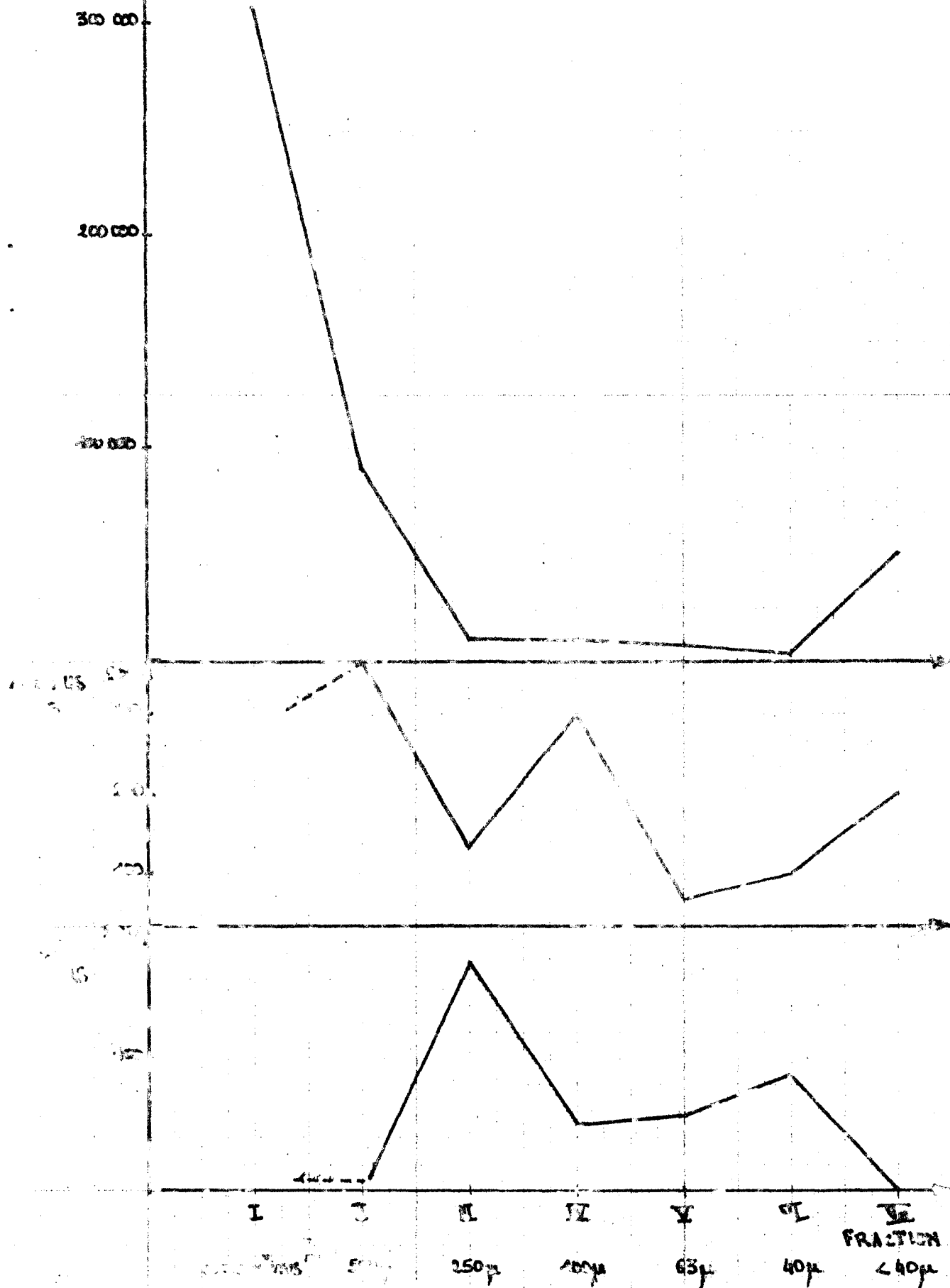
FRACTION

DISTRIBUTION DES TOXINES SUR LES AMAS MIXTES CORALLIENS



NTA en
TONNES

FIG. 20: CORAUX MORTS JUIN 1976



DISTRIBUTION DES CORAUX SUR LES GRANDES FRACTIONS CORALLIENS

MTX en
US TOTALES

FIG 12: CORRAUX, MORTS NOV 1977

150 000

100 000

50 000

CTX en US
TOTALES

6 000

4 000

2 000

NOMBRE
DIPLOSAUS
EN MILLION

15 M

10

5

I
coraux "morts"

II
500 μ

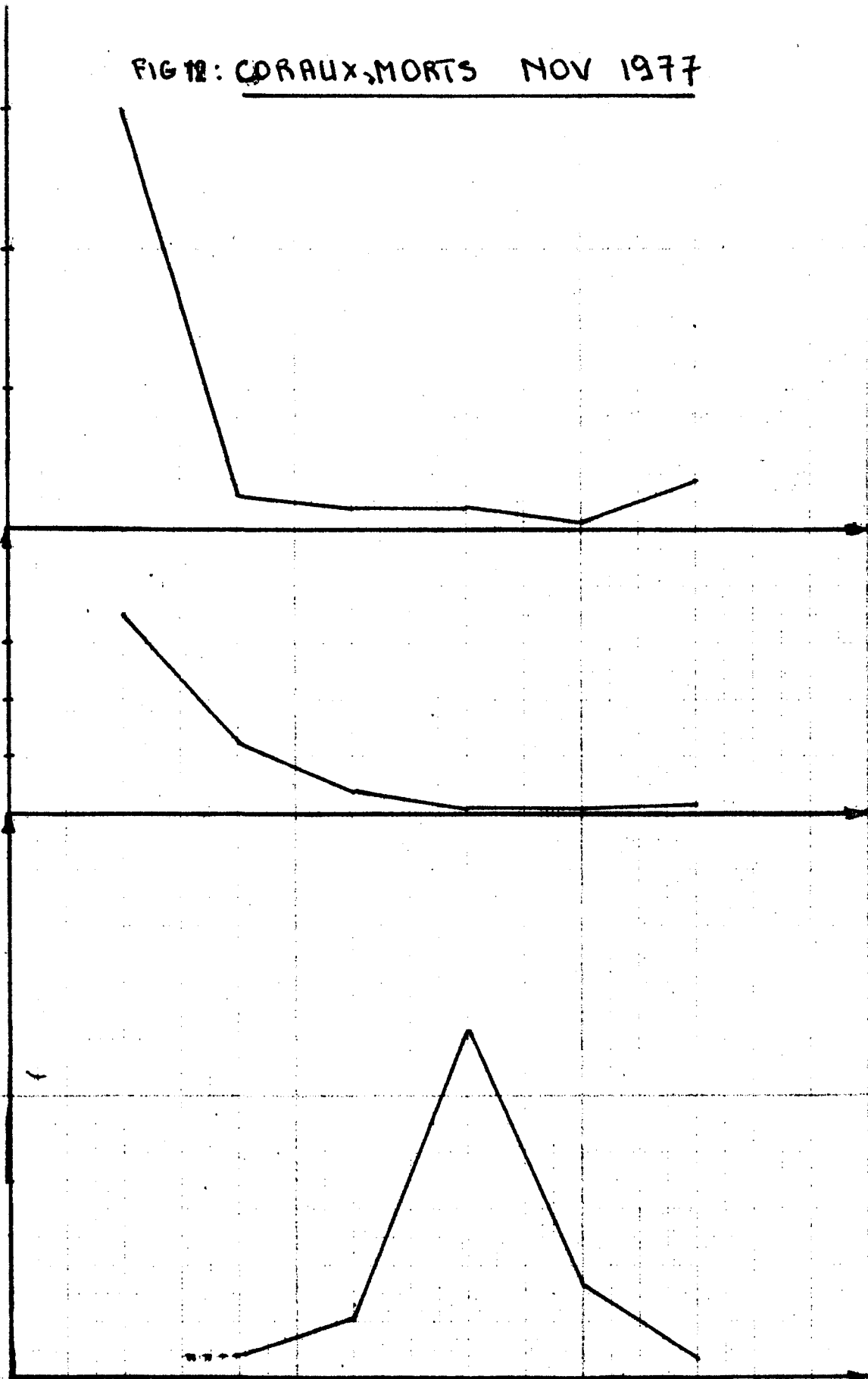
III
100 μ

IV
65 μ

V
42 μ

VI
< 42 μ

DISTRIBUTION DES TOXINES SUR LES AMAS MIXTES CORALLIENS.



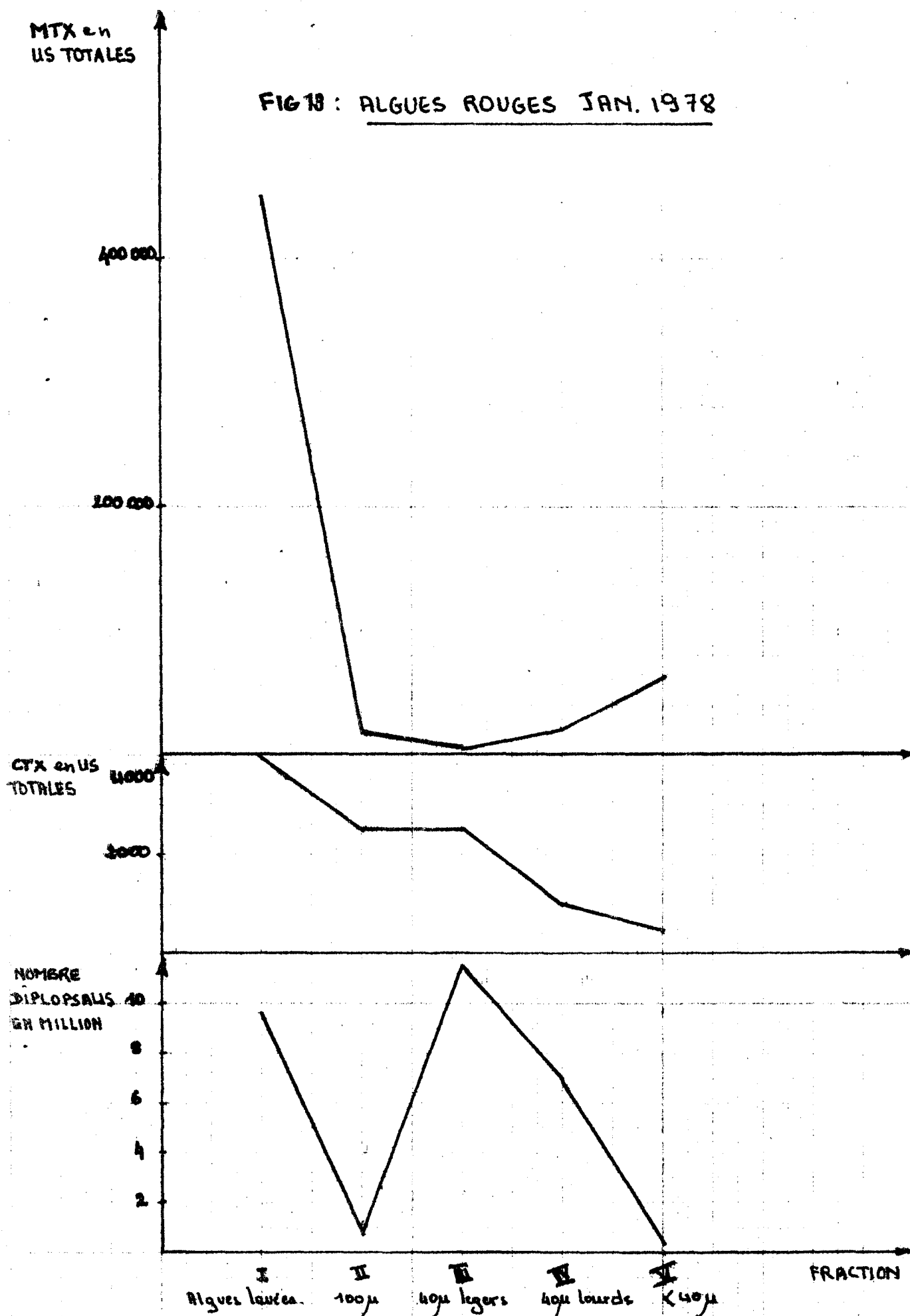


FIGURE : DISTRIBUTION DES TOXINES SUR LES AMAS MIXTES D'ALGUES ROUGES

- A. Il semble exister parfois au sein des amas mixtes coralliens certaines variations biométriques chez les *Diplopsalis* sauvages. Alors que dans les prélèvements de Mai 1974 et Novembre 1977, la majorité des cellules comptées se trouve dans la fraction 65 μ , dans ceux de Juin 1976 on observe deux populations distinctes : l'une de taille légèrement inférieure (entre 65 et 40 μ), l'autre de très grande taille ($> 250 \mu$).
- B. La quantité de CTX et MTX recueillie dans les diverses fractions résultant des tamisages successifs n'est pas toujours proportionnelle au nombre de *Diplopsalis* comptés. Il existe parfois même des résultats très discordants. Ainsi au niveau des recouvrements biologiques des galets coralliens en Mai 1974, la relation de proportionnalité est satisfaisante. Mais il en va tout à fait différemment en juin 1976 et novembre 1977 où la relation CTX et MTX d'une part et Dip.G d'autre part est soit inexistante, soit inversement proportionnelle dans toutes les fractions (à une exception près concernant les individus de 40 à 65 μ en 1976 pour CTX). Par ailleurs dans ces deux derniers prélèvements c'est au niveau des galets coralliens déjà grattés (coraux nus) que se trouve la plus forte ciguatoxicité. Même si l'on admet qu'après grattage une quantité non négligeable de Dip.G (dont la numération est impossible) reste solidement fixée au substrat dans les interstices coralliens, on peut toutefois se demander si la toxicité enregistrée leur est entièrement imputable. Cette hypothèse est étayée aussi par la présence d'une certaine toxicité dans les fractions $< 40 \mu$ où aucun Dip.G intact n'a pu être mis en évidence. Là encore le passage vraisemblable de débris cytoplasmiques à travers les mailles de 40 μ ne suffit peut être pas à **lui** seule à expliquer toute la MTX et la CTX décelée.
- C. En ce qui concerne les amas mixtes associés aux algues calcaires rouges, le fractionnement suivant la taille des particules conduit à des données contradictoires quant aux rapports Dip.G - ciguatoxicité. En effet c'est dans la fraction la plus fournie en ces périodiniens (107 millions d'une taille de 40 à 100 μ) que l'on note la plus faible quantité de MTX. Par contre 9,8 millions d'individus restés accrochés aux algues après lavage produisent 450 000 US. Une certaine quantité de MTX se retrouve aussi dans la fraction $< 40 \mu$. Ces contradictions existent aussi pour MTX, mais sont moins marquées.

./...

D. La concentration de MTX et CTX dans les *Dip.G* n'est pas constante. Il semble exister des fluctuations importantes dans la sécrétion respective de ces deux substances suivant le moment du prélèvement et les facteurs d'ambiance. Si la productivité de MTX est toujours supérieure à celle de CTX, le rapport $\frac{MTX}{CTX}$ peut varier de 3 à 30.

E. Les diverses observations précédentes suggèrent la possibilité de l'existence à côté de *Dip.G* d'un autre microorganisme toxinoproduteur de petite taille < 40 μ très fortement incrusté dans le substrat corallien ou amarré aux algues calcaires (bactérie ou autre Dinoflagellé).

3.3.3. Toxicité des biodétritus associés aux galets coralliens (Station 4, Hitiaa).

L'extraction a porté sur les recouvrements biologiques de 12 kg de débris madréporiques collectés le 7 Juin 1977. Aucun Dinoflagellé *Dip.G* ou *Per H* n'a pu être compté au niveau du résidu papier filtre où ils sont en principe concentrés.

La toxicité globale obtenue à partir de 75 g de biodétritus se résume à 40 US de MTX et 150 US d'une toxine liposoluble dont le comportement sur colonne d'acide silicique est identique à CTX mais dont les effets cliniques sur souris sont différents.

Ce résultat montre qu'en l'absence de *Dip.G*, les amas mixtes couvrant les coraux morts sont atoxiques. Cela confirme des données antérieures recueillies tant à Hao qu'à Tahiti.

3.3.4. Toxicité des Dinoflagellés benthiques *Per H.* associés à *T. ornata* (Station Mu.2, PAPEETE)

A.- Collecte du 27 Juin 1977
= =====

Nous avons procédé le 27 Juin à une collecte massive de *Turbinaria ornata* (400 pieds possédant de 15 à 36 feuilles). Après agitation dans un grand sac en plastique contenant de l'eau de mer, les algues sont retirées et l'eau de mer filtrée sur quatre épaisseurs de gaze hydrophyle pour éliminer les gros débris. Le filtrat est placé à décanter dans des bocaux de deux litres à 20°C. Une estimation de la quantité de *Per H.* dans des culots de décantation porte le nombre des flagellés à $18-10^6$. On procède ensuite à un tamisage successif des culots de décantation à 100, 65 et 42 μ suivi d'une centrifugation à 4 000 t/mn. Le surnageant est alors filtré sur filtre millipore (8 puis 0,8 μ).

./....

Chaque fraction est extraite au méthanol bouillant et chaque résidu liposoluble et hydrosoluble est testé sur souris. Les résultats sont détaillés dans le tableau VIII du rapport C.P.S. réf. N° 519/IRM/K.10. Ils montrent que la toxicité d'ensemble des *Per H.* récoltés sur *T. ornata* est faible. Seules 1 460 US de toxine semblable à la MTX (de par son comportement chromatographique et son action sur la souris) ont été obtenues dans quatre culots de décantation après filtration sur gaze. L'eau filtrée à 0,8 μ contient 500 US de toxine hydrosoluble mais différente de MTX soit 50 US pour 30 l d'eau de départ. Par ailleurs, la toxine liposoluble retrouvée à un taux très faible (286 US pour $18 \cdot 10^6$ (cellule)) n'induit pas des signes caractéristiques de la CTX chez la souris.

Remarques : Le tamisage successif est inefficace. Les péri-diniens se mettent en amas et se distribuent dans toutes les fractions obtenues. De plus une grande partie reste emprisonnée dans les dépôts décrochés des feuilles de *T. ornata* si l'on en juge par les résultats d'extraction du "résidu gaze" (1 320 US contre 1 460 US dans le filtrat gaze) et le comptage des *Per H.* dans le résidu gaze provenant de la collecte du 6 Juillet 1977.

B.- Collecte du 6 Juillet 1977.

= =====

Dans le but de mener à une étude biochimique plus complète des toxines liposolubles et hydrosolubles des *Per H.*, nous avons procédé à une deuxième collecte de *T. ornata* (Motu Uta, Station N° 2) soit 830 pieds. Le nombre de *Per H.* a été estimé à $30 \cdot 10^6$ dont $18 \cdot 10^6$ restent emprisonnés dans les débris et dépôts retenus par les épaisseurs de gaze (1500 μ). Compte tenu des remarques précédentes, une extraction globale des divers résidus de tamisage (> 500 μ , > 42 μ et > 0,8 μ) et une extraction d'un échantillon d'eau filtrée (200 ml) ont été réalisées. Malheureusement le nombre d'US obtenu ne nous a pas permis de poursuivre plus loin que ce qui a déjà été fait avec les extraits provenant de la première collecte. Sur les 1 500 US de MTX et 1 150 US de toxine liposolubles, 690 US de MTX et 490 US de toxine liposoluble pourront être attribuées aux $12 \cdot 10^6$ *Per H.* comptés dans le filtrat gaze. Le tableau 5 montre la toxicité des échantillons exprimés en nombre d'US/*per. H.*

./...

TABLEAU 5D: Toxicité des Per H. de MOTU UTA (collectés sur *Turbinaria ornata*).

COLLECTES	FILTRAT GAZE	NOMBRE DE PER H.	TOXICITE US/PER H.
Juin (400 pieds)	1 460	18-10 ⁶	81-10 ⁻⁶
Juillet (830 pieds)	690	12-10 ⁶	57-10 ⁻⁶

3.3.5. Toxicité des biodétritus associés aux galets coralliens (Station MU 2, PAPEETE).

69 kg de galets coralliens collectés à Motu Uta le 24 Juin 1977 ont été grattés et extraits suivant la méthode habituelle exposée lors de la dernière réunion du Comité d'Experts. Les résultats obtenus montrent que, comme pour les fractions provenant de *T. ornata*, les péridiniens sont concentrés dans le résidu gaze (> 500 µ) renfermant 320 000 Per H., qui s'avère le plus toxique. Par contre le nombre de cellules comptées dans le filtrat gaze est très faible soit 192 190 pour 514 g de recouvrements soit autant pour les *T. ornata* où le nombre de Per H. est au contraire très élevé (12 à 18-10⁶).

La toxicité globale se résume à 665 US de MTX et 50 US de toxine liposoluble différente de CTX mais analogue à celle des Per H. provenant des *T. ornata*. Elle est concentrée dans la fraction la plus riche en péridiniens c'est à dire le résidu > 500 µ. Seules 200 US de MTX ont pu être retrouvées dans le filtrat gaze (> 500 µ) donc pour 192 190 Per H. La toxicité des Per H. est équivalente à 1040 - 10⁻⁶ US/Per H. soit 12 à 18 fois supérieure à celle des Per H. récoltés sur *T. ornata*.

Ces chiffres sont cependant dérisoires quand on les compare à ceux obtenus parfois pour *Dip.G* (3-10⁻³ US de MTX par individu), ce qui représente environ 3 millions de fois plus de toxine. On peut donc considérer que dans les conditions expérimentales, Per H. ne participe pas à la biogénèse de la ciguatera comme le confirme les données du tableau 6.

./...

TABLEAU 6. TOXICITE DES RECOUVREMENTS BIOLOGIQUES CORALLIENS
DE HITIAA ET PAPEETE.

LIEU ET DATE	PERIDINIER H.	DIPLOPSALIS	TOXINE LIPOSOLUBLE	M.T.X
HITIAA Coraux Juin 77	0	Aucun compté	144 US ≠ C.T.X.	36 US
PAPEETE Coraux Juin 77	22500	Aucun compté	132 US ≠ C.T.X.	132 US
PAPEETE Coraux Juin 77	4500	Aucun compté	80 US ≠ C.T.X.	20 US
PAPEETE Coraux Juillet 77	450000	Aucun compté	50 US ≠ C.T.X.	840 US
PAPEETE Turbinaria Juin 77	18.000.000	-	286 US ≠ C.T.X.	2780 US
PAPEETE Turbinaria Juil. 77	30.000.000	-	1150 US ≠ C.T.X.	1500 US

3.4. EVOLUTION COMPAREE DE LA TOXICITE DES CTENOCHAETUS STRIATUS ET DES POPULATIONS DE DIP. G ET PER H.

3.4.1. Données relatives à Hitiaa (Station 4) - Tahiti

La figure 14 représente l'évolution de la population de *Diplopsalis* et de la toxicité de la chair, du foie et des viscères des *C. striatus* pendant une année. On remarquera que les corrélations entre la densité de *Dip.G* et la ciguatoxicité n'apparaissent pas de façon évidente. Alors que le péridinien toxinoproduteur a pratiquement disparu du récif depuis le mois d'avril 1977. Les *C. striatus*, malgré une baisse sensible de leur toxicité digestive et musculaire depuis Mars 1977, continuent à présenter des fluctuations peu compréhensibles de leur toxicité hépatique. Il y a là, matière à réflexions.

3.4.2. Données relatives à Papeete (Station MU 2) - Tahiti

La totale inocuité actuelle (selon la rumeur publique) des *C. striatus* pêchés aux abords des stations 2 et 3, méritait d'être confirmée à la lumière d'une part de l'absence de *Dip.G* d'autre part de l'abondance de *Per H.* Par ailleurs les rapports pouvant exister entre les variations de populations de Dinoflagellés et l'apparition d'une flambée de ciguatoxicité dans une zone réputée indemne, impliquait des observations régulières dont les résultats sont présentés par ailleurs.

Quatre prélèvements de *C. striatus* ont eu lieu en Juillet, Novembre, Décembre 1977 et Mars 1978. Ces poissons sont de plus petite taille que ceux de Hitiaa. Leur chair et foie sont atoxiques, sauf pour le foie du mois de Mars 1978 : 9 US/g. Les viscères ont le même niveau de toxicité que pour ceux de Hitiaa, aux environs de 5 US/g. La figure 15 montre l'absence totale de corrélation entre l'abondance de *Per H.* et la ciguatoxicité des *C. striatus*.

NOMBRE
DIPLOPSALIS

FIG 141 : DYNAMIQUE DE POPULATION DES DIPLOPSALIS

ET TOXICITE DES C. STRIATUS A HITIAA.

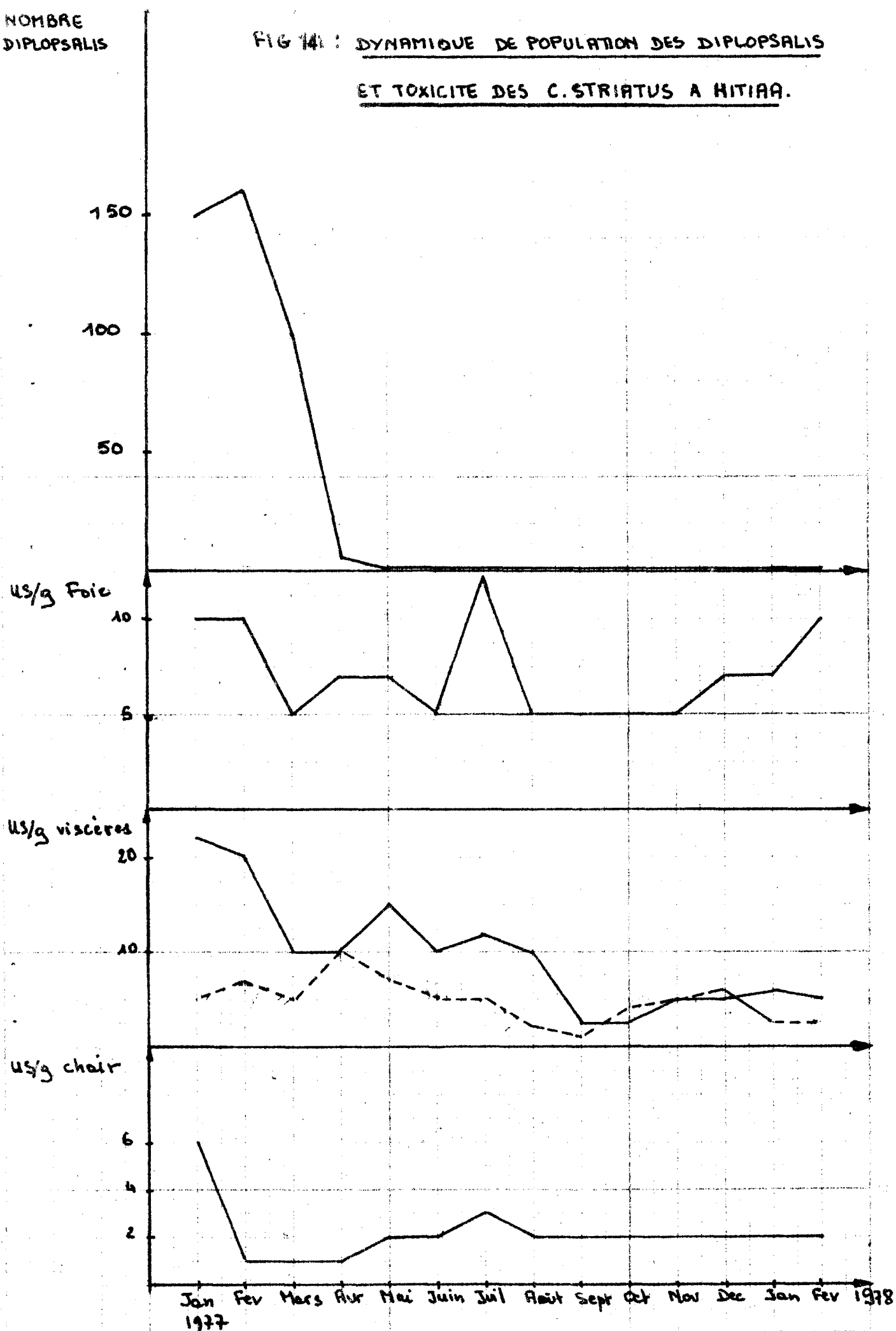
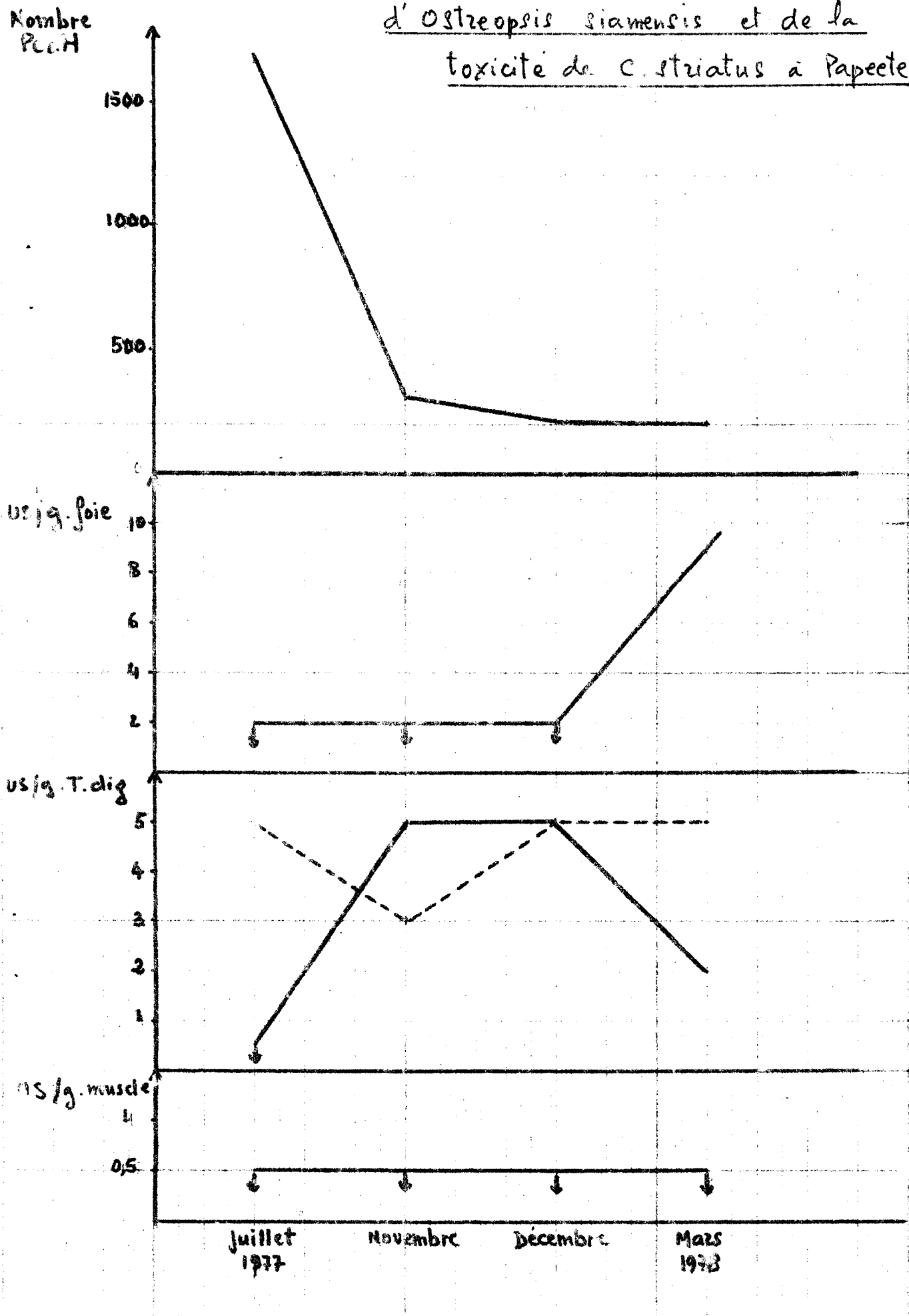


FIG 15 : Evolution comparee des populations
d'*Ostreopsis siamensis* et de la
toxicité de *C. striatus* à Papeete



4 - ASPECTS MICROBIOLOGIQUES : CULTURES MONOALGALES NON AXENIQUES

Les algues ont été isolées à partir de prélèvements frais ou de cultures primaires (eau de mer + 1/10 à 1/100 du prélèvement frais + complément nutritif) maintenues éclairées ou en lumière atténuée. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux espèces potentiellement toxiques et qui sont abondantes ou fréquentes dans les revêtements algaux toxicophores.

Il est bien certain que le groupe des Cyanophycées est très insuffisamment représenté dans les cultures par rapport à ce qu'il l'est dans la nature. Hormis ces dernières, toutes les algues cultivées sont benthono-planctoniques.

L'isolement des souches s'est fait par pipetage à la pipette Pasteur après dilution quand cela était nécessaire, lavage 4 à 6 fois et repiquages successifs dans le milieu nutritif (eau de mer enrichie). Le nombre des cellules au départ était toujours très faible : 15 à 30 par tube de 7 ml à 10 ml (sauf pour les Cyanophycées).

La sélection et la différenciation des souches de *Diplopsalis* se font en utilisant des cultures mères mixtes plus ou moins illuminées et en isolant des cellules nouvelles tous les 3 à 5 jours pendant 3 semaines ; on a pu ainsi obtenir au moins 2 types différents de cultures de *Diplopsalis*.

Le milieu de culture est à base d'eau de mer (Gambier ou Tahiti), filtrée à 0,4 micron, amenée au pH 8,2, séparée du floculat de stérilisation (20 mn à 115-120°C) quand il existe, et à laquelle on ajoute 2 % du complément ESI de PROVASOLI. L'irrégularité de la croissance de *Diplopsalis* avec de l'ESI stérilisé dans les mêmes conditions que l'eau de mer nous a conduit à employer du complément non stérilisé.

La température de la salle de culture initialement trop basse (22-27°C) a été stabilisée à 25-29°C.

L'éclairement des 0,75 m² de culture est assuré par 4 tubes Fluorescents 40 W (3 blanc industrie ou cool white, 1 lumière du jour) à 0,70 m de distance sur un rythme de 12 heures maintenu par une horloge électrique.

4.2. Résultats

4.2.1. Diplopsalis sp. (Figure 16)

A - C'est un péridinien de 50 à 70 microns, arrondi en vue **sup.** ou **inf.** avec l'encoche oblique très caractéristique du sulcus, lenticulaire aplati en vue latérale ; sa morphologie est identique aux Gambier et à Tahiti. Dans la nature, il est assez mobile mais possède une flottabilité négative, si bien qu'il sédimente facilement sur le benthos, coloration globale de la cellule est variable : de brun clair à brun foncé selon l'abondance des pigments chlorophylliens (aspect clair aux Gambier par contre les quelques Diplopsalis observés à Tahiti sont fortement colorés).

B - Deux types de Diplopsalis se sont différenciés en culture. Les premiers isolés ont une taille moyenne de 75 microns, un aspect globuleux très irrégulier, les caractères de la thèque se retrouvent mais la surface est bosselée, la mobilité est faible à nulle la coloration foncée. La croissance lente plafonne à 700 cellules/ml environ. Les kystes sont abondants et très souvent dégénérés ; pas de libération de spores. Sur une série de tubes, les résultats sont très irréguliers : environ 1/3 des cultures ne se développent pas et meurent, 1/3 végètent, 1/3 se multiplient très lentement. Les thèques des cellules mortes s'accumulent, elles ne sont pas détruites par les autres micro-organismes présents.

A partir de la culture mère vieille (15 à 20 jours), d'autres cellules de taille plus faible (55 microns) se sont différenciées. L'aspect lenticulaire, les irrégularités thécales existent encore. La mobilité est bonne. La croissance est rapide et atteint un niveau élevé (4000 cel/ml). La mitose paraît normale ; les kystes sont rares. Sur une série de tubes la pousse est comparable. Enfin on observe un développement bactérien abondant et stable où l'on peut reconnaître sans doute des Cocci et très certainement des Actinomycètes ; les thèques des cellules mortes sont détruites par ces microorganismes. L'équilibre algues-bactéries paraît bon, on pourrait parler plus de symbiose que de compétition.

C - Influence des bactéries.

Pour savoir quel pouvait être le rôle de la souche algale et celui des bactéries associées, nous avons pratiqué deux tests complémentaires :

- Adjonction des bactéries, associées aux cultures de petites tailles, à une culture de Diplopsalis à la multiplication particulièrement lente, ensuite lavage des Diplopsalis de petite taille.

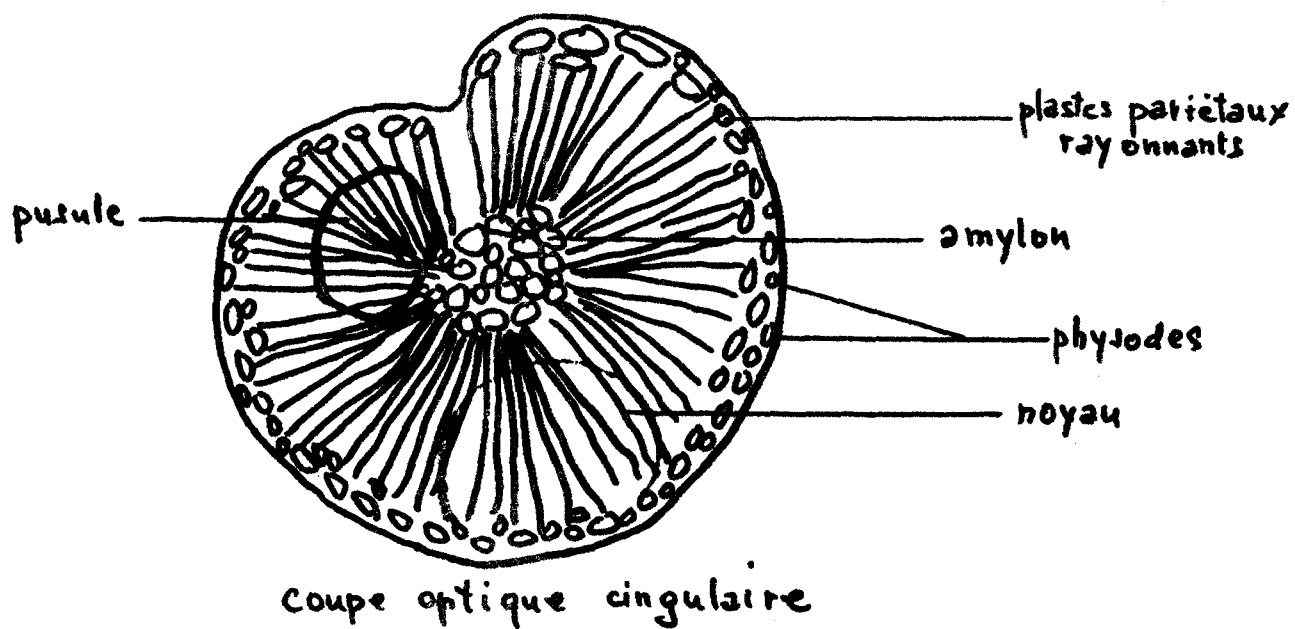
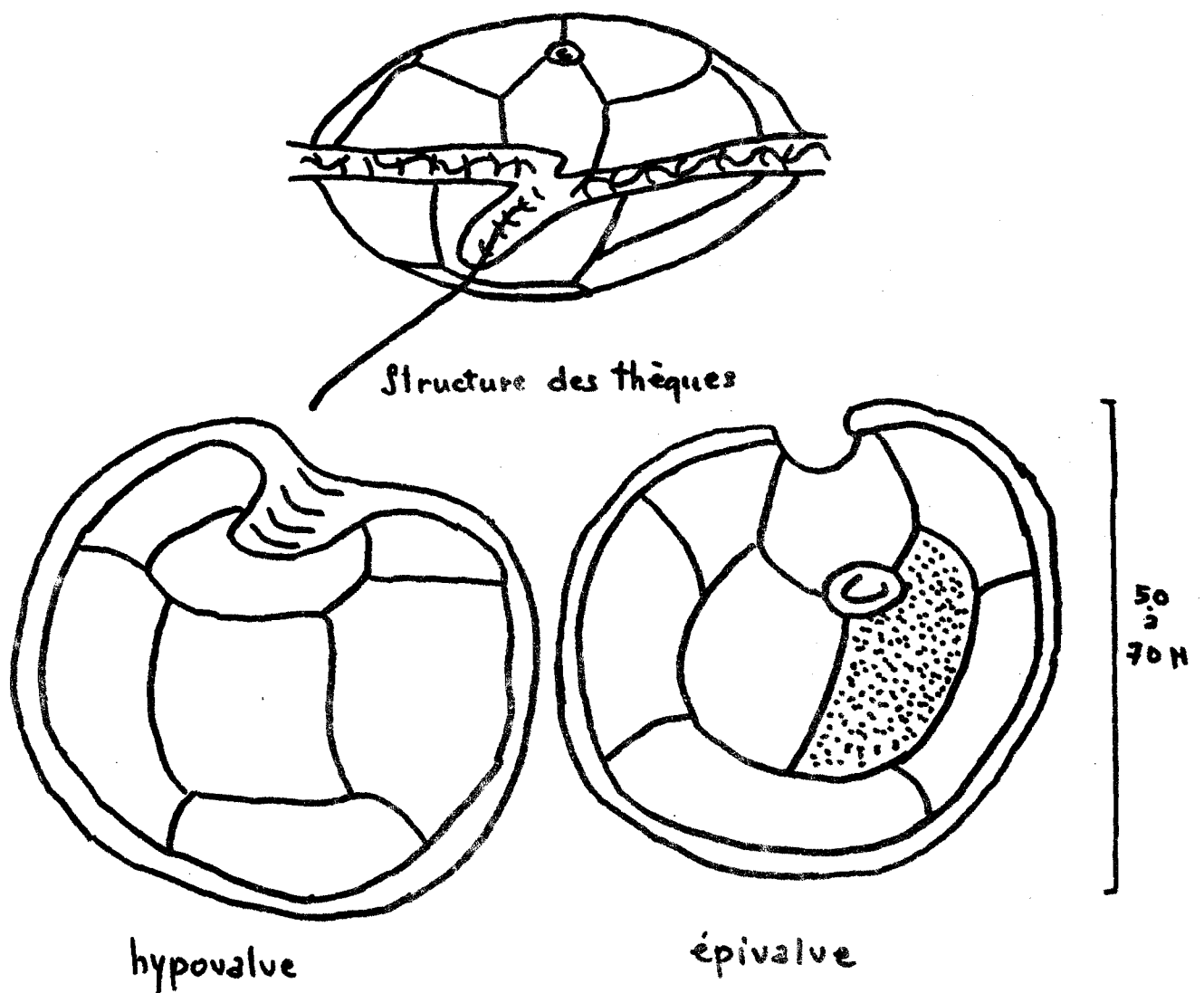


Figure 16. *Diplosaplis* sp.

Ces deux tests montrent d'une part que la souche d'algue est apparemment différente et d'autre part que si les bactéries associées facilitent beaucoup la croissance de Diplopsalis, elles ne sont pas suffisantes pour transformer une culture à croissance très lente en culture à croissance rapide.

D - Adjonction de substances organiques.

Nous avons ajouté à des cultures "lentes" de Diplopsalis des proportions variables d'extrait de terre : 1 %, 3 %

de glycérol : 0,1 Mole, 0,01 Mole/
Litre

d'extrait de levure: 0,1 % 0,4 %

sous éclairage normal et en semi-pénombre mais sans obtenir de résultats positifs exploitables ; le développement bactérien contrariant la croissance des algues.

E - Influence du contenant.

Diplopsalis est une algue plus benthique que planctonique, c'est une algue de paroi et la surface de culture doit être importante. On obtient une croissance plus rapide et plus régulière dans des ballons de 250 ml que dans des bouteilles de 1500 ml. Pour favoriser le détachement des Diplopsalis, un brassage régulier de la culture serait sans doute efficace, mais tout en évitant un trop grand mélange des amas bactériens et des algues ; Diplopsalis se tenant spontanément à la périphérie des amas de bactéries,

F - Discussion

Diplopsalis sp. apparaît comme un Dinoflagellé assez typique, c'est une algue mixotrophe, très sensible à la présence des vitamines du groupe B et qui a besoin pour se développer normalement d'autres substances de croissance non déterminée, comme l'ont montré les variations de la courbe de croissance et de l'aspect des divisions cellulaires (mitoses lentes, télophase bloquée, kystes) et plus particulièrement de l'allure de la thèque (lisse ou au contraire festonnée, ondulée ; plaques thécales polygonales avec bandes intercalaires fines ou plaques très déformées rendant à la limite la détermination thécale impossible) qui sont autant de caractères permettant de juger de la physiologie normale de Diplopsalis.

L'existence d'une population bactérienne stable a permis de régulariser le développement de l'algue, mais la morphologie est restée irrégulière à l'intérieur d'une même culture et entre les différentes cultures. Le Glycérol par son action directe ou plus vraisemblablement grâce au développement bactérien qu'il a favorisé, a montré une action régulatrice intéressante sur la morphologie.

Le caractère prédateur de *Diplopsalis* vis-à-vis des microorganismes n'a pas été mis en évidence, mais les variations de coloration des plastes aussi bien en culture qu'in vivo associés à la grande faculté de concentration d'amylon, font supposer que *Diplopsalis* est capable d'absorber des substances organiques court-circuitant ainsi la photosynthèse.

Le milieu de culture utilisé (ES1 de PROVASOLI) donne une croissance correcte mais il faudrait essayer d'autres milieux où l'apport organique serait plus important et où la concentration de NO_3 ou PO_4 serait le double ou le triple de celle de l'ES1.

4.2.2. Per H₁ (Ostréopsis siamensis selon Fukuyo et Adachi (figure 17))

C'est un dinoflagellé cuirassé comme Diplopsalis, plus volumineux (60 - 90 microns), légèrement piriforme en vue sup. ou inf., lenticulaire asymétrique en vue latérale.

La souche provenant de Tahiti atteint le plateau de culture à 400 cell/ml en 3 semaines (inoculum initial 50 cell/ml). Cette algue très commune à Tahiti existe aussi aux Gambier.

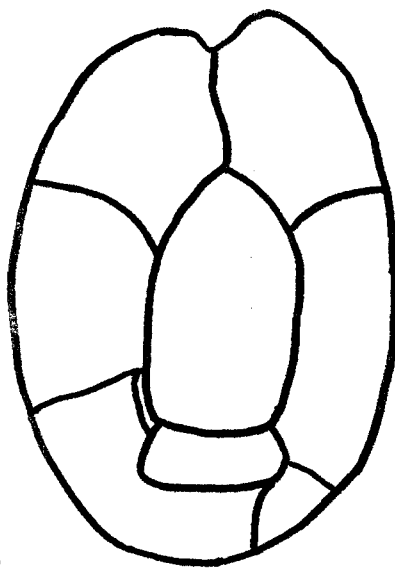
4.2.3. Per H₂ (Ostreopsis siamensis selon Fukuyo et Adachi) Figure 17)

Isolé des eaux tahitiennes, c'est un petit dinoflagellé oblong de 40 à 45 microns de long, à la thèque peu épaisse ; la structure des plaques est invisible sans préparation.

Il paraît assez sensible aux pollutions bactériennes. Il se multiplie par bipartition oblique ; e, partant de 100 cell/ml, on obtient 15000 cell/ml en 10 à 15 jours.

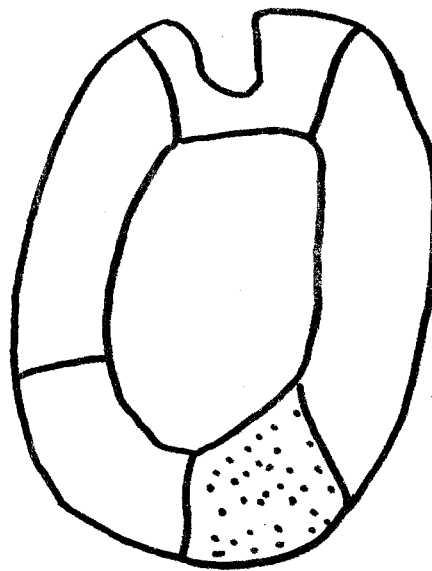
4.2.4. Per "minusculum" (figure 17)

Nous utilisons la spécification "minusculum" pour le différencier, mais il semble différent du véritable péridinien minusculum. On



épivalve

60
à
90µ

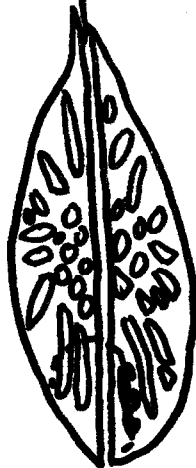


hypovalve

Pez H1
(*Ostreopsis siamensis*)

Structure des
thèques

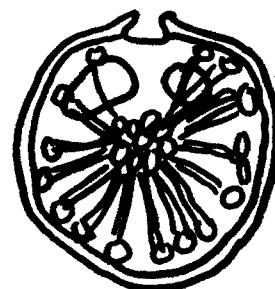
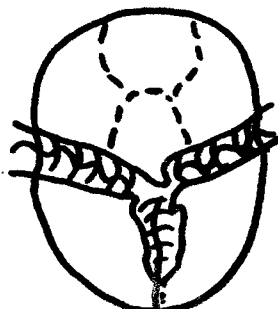
40
à
65µ



Pez H2

(*Ostreopsis siamensis*)

25
à
40µ



Per. minusculum.

Figure 17

le trouve aux Gambier mais également très régulièrement autour de Tahiti, arrondi (25 à 40 microns) de coloration variable dans la nature, sa structure thécale est très dure à mettre en évidence. En culture il reste très mobile, mais prend une couleur plus foncée, il se multiplie par bipartition oblique et atteint 45000 cell/ml en 3 semaines à partir de 100 cell/ml.

4.2.5. Amphidinium I, II, III (figure 18)

Ce sont de petits dinoflagellés très mobiles, non cuirassés, des représentants du même genre sont parfois à l'origine d'"eaux rouges" toxiques.

Amphidinium sp. I, longueur 10 à 15 microns, plastes pariétaux, très mobile, division binaire oblique, lobe antérieur assez fin et pointu. On obtient en culture entre 4 et 9×10^3 cellules par ml.

Amphidinium sp. II, longueur in vivo 40 microns, plastes focalisés sur un amas d'amylon, il est peu mobile, le lobe antérieur est fin mais court ; division binaire oblique, croissance lente. La souche isolée est morte (pollution bactérienne) après avoir atteint 25 à 4000 cellules/ml.

Amphidinium sp. III, longueur 15 à 30 microns ; plastes focalisés sur un pyrénoïde, lobe antérieur trapu, sulcus postérieur marqué ; reproduction par kystes pas de divisions de formes mobiles observées. On peut voir dans les cultures des kystes à 2 et à 4 spores, des formes petites, peu mobiles et arrondies et d'autres très mobiles allongées à gros noyau ; tout laisse à penser qu'il doit y avoir une reproduction sexuée.

EXUVIELLA sp. (figure 19)

Isolée à Tahiti mais présente aussi aux Gambier, potentiellement toxique, cette algue de taille moyenne (30 à 40 microns) est peu mobile en culture, alors qu'elle l'est in vivo, mais elle garde ces caractères morphocytologiques normaux. La division est longitudinale, le plateau de culture s'obtient pour une concentration de 1×10^5 cell/ml.

CRYPTOCHRYISIS sp.

Isolée à partir d'une culture mère des Gambier, cette petite algue (8 à 10 microns) biflagellée est très mobile. La division est longitudinale ; les cultures prennent un aspect rougeâtre caractéristique.

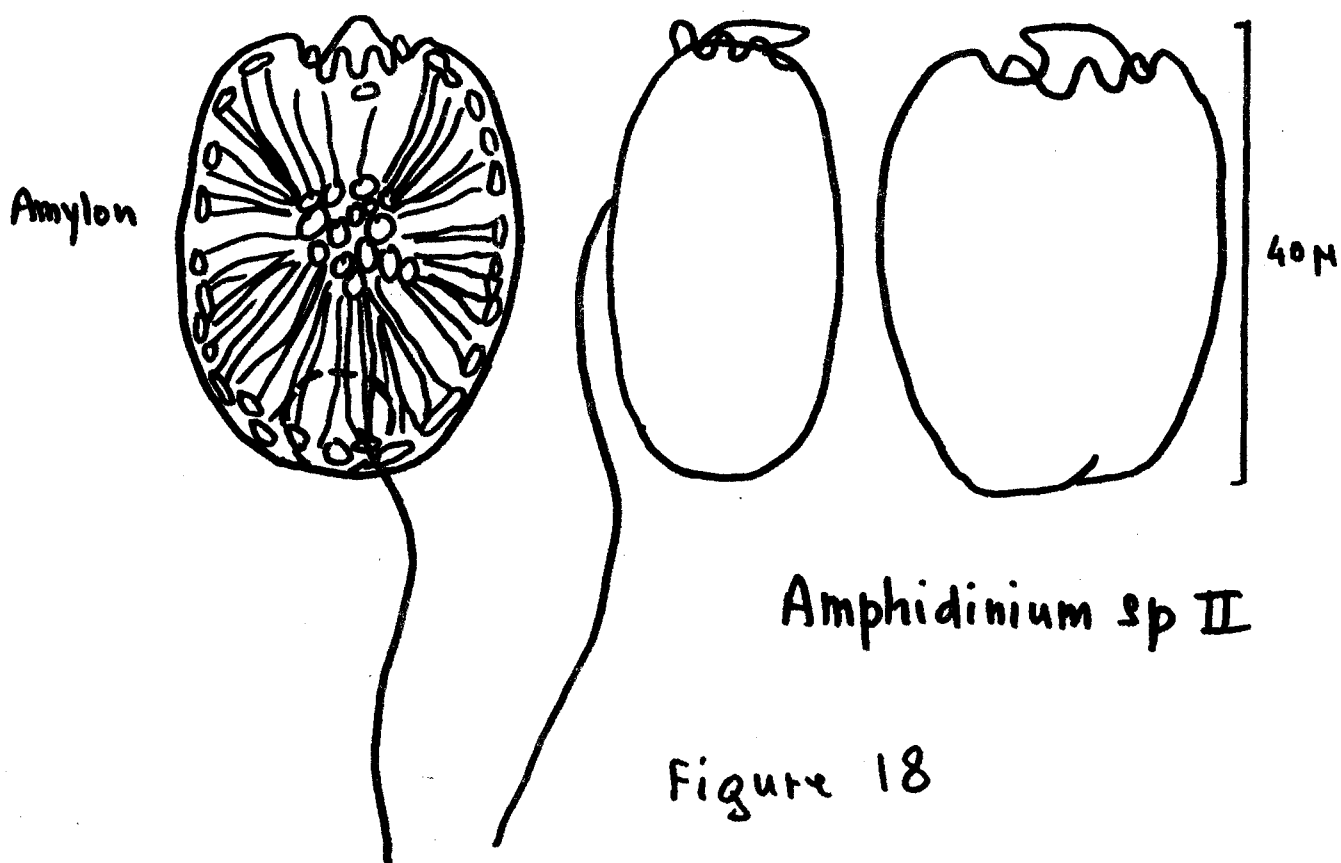
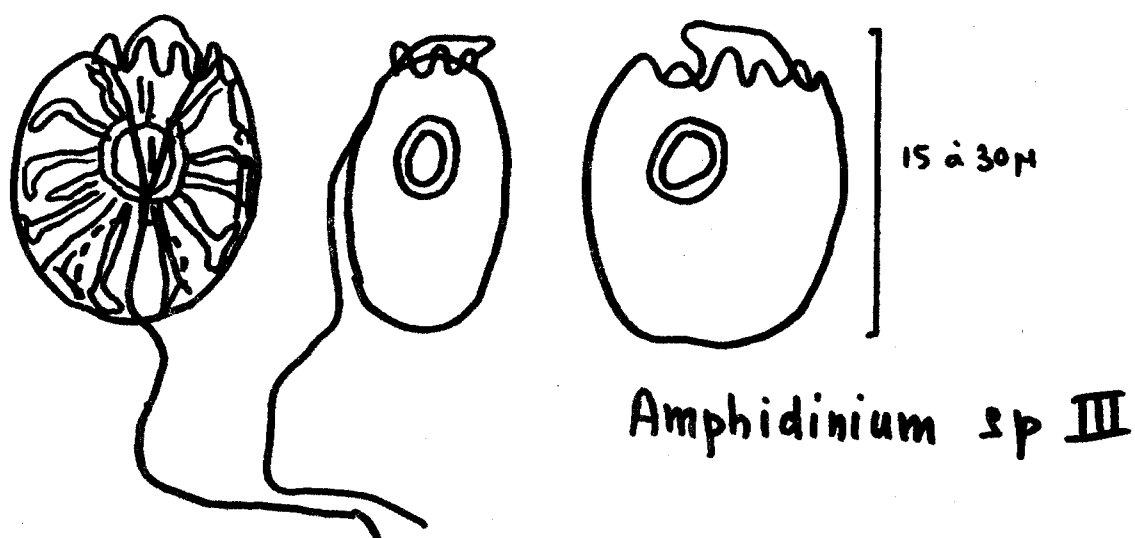
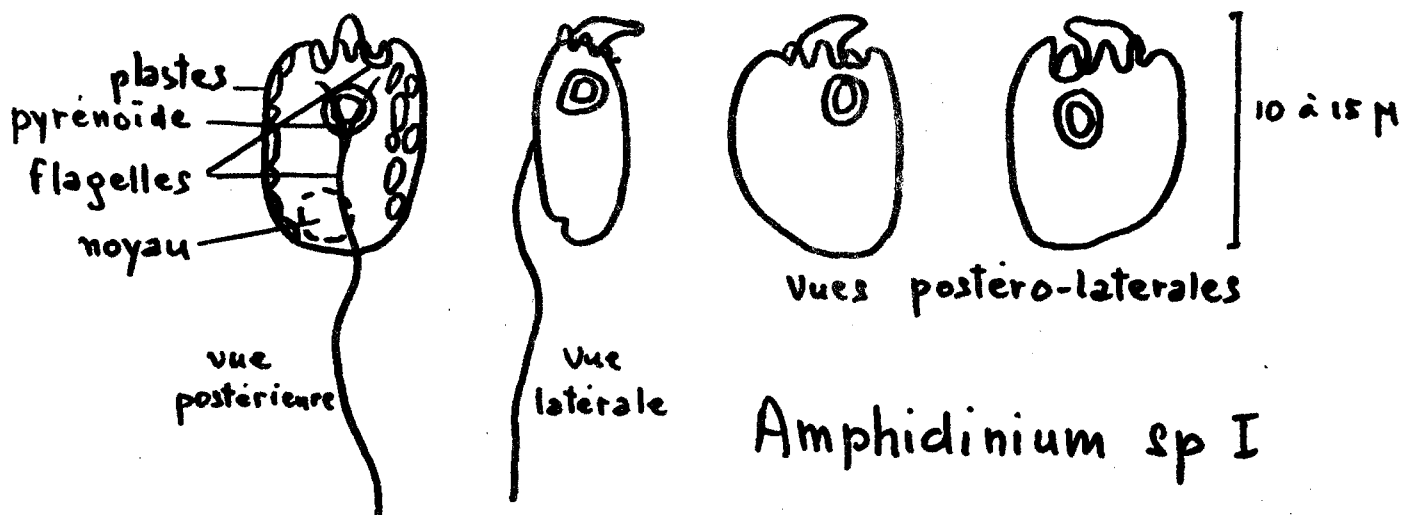
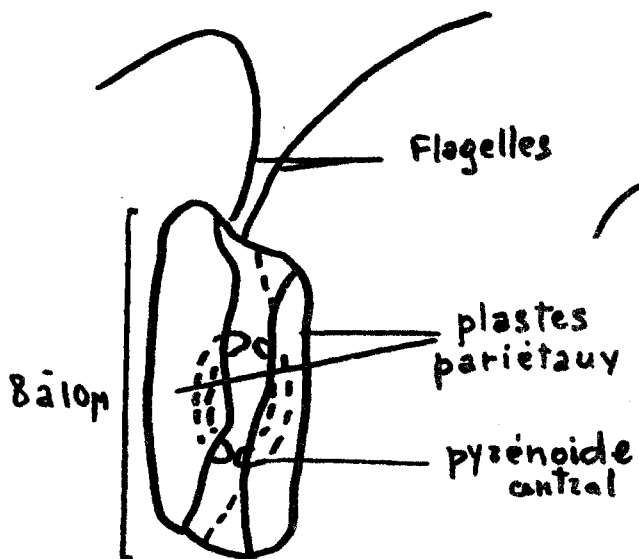
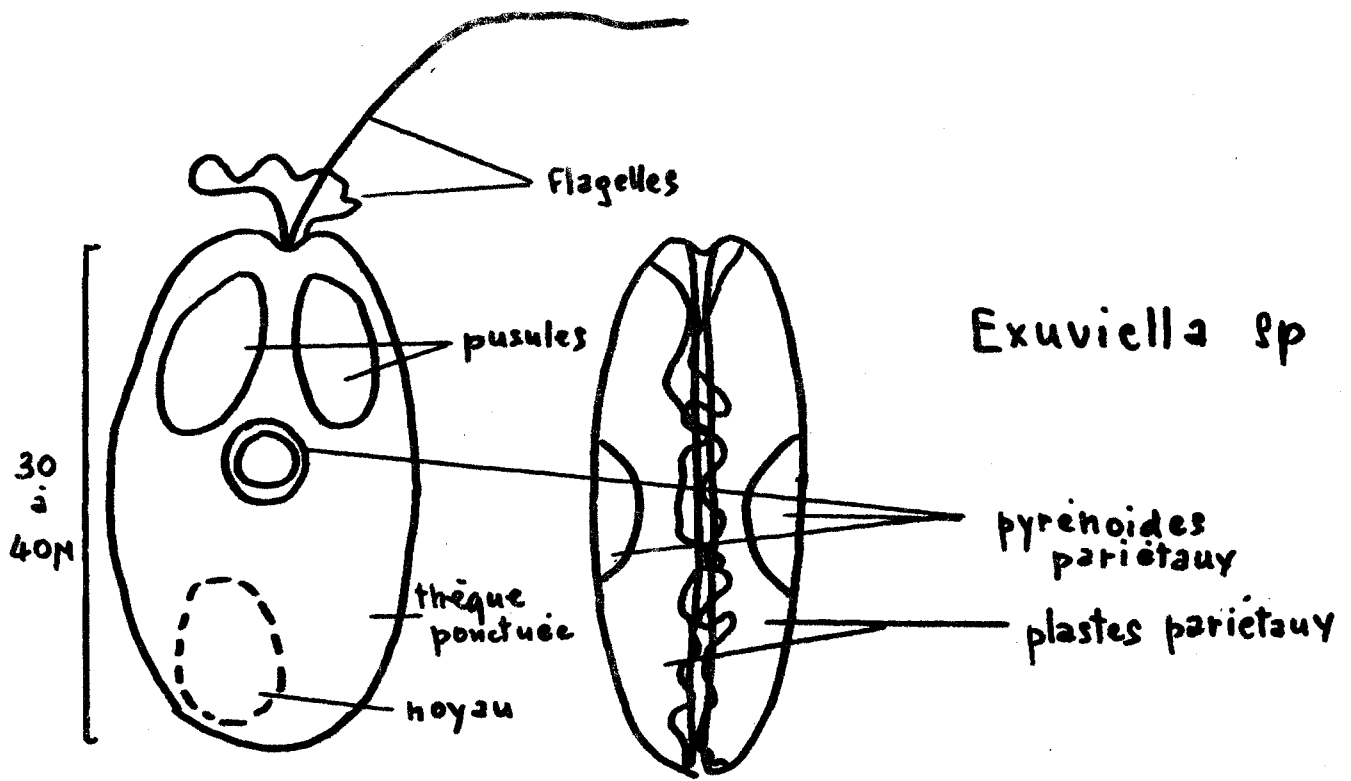
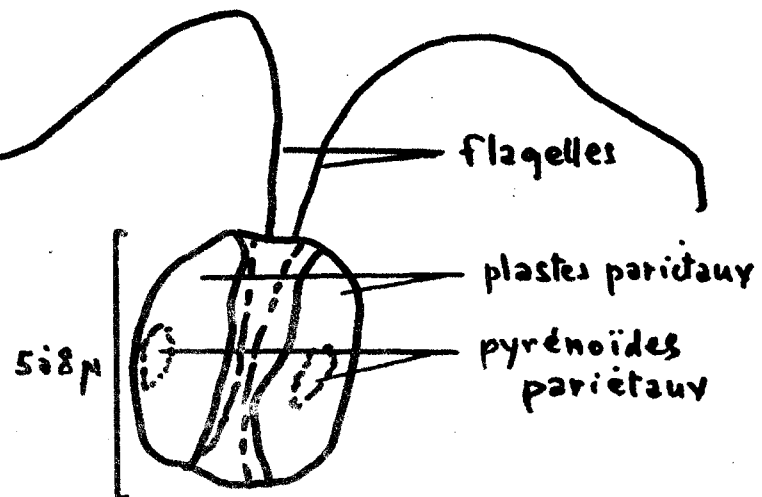


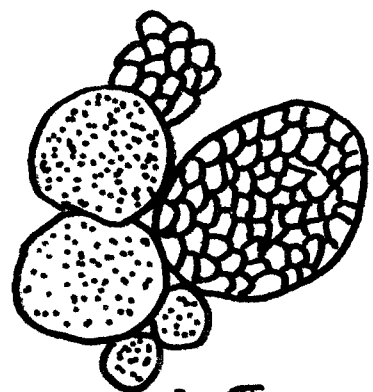
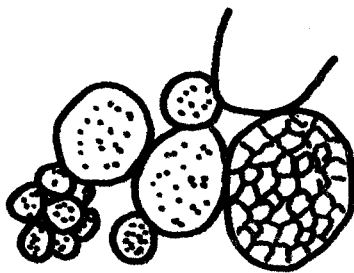
Figure 18



Cryptochrysis sp.



Isochrysis sp.



Chroococcopsis
Figure 19

ISOCHRYSLIS sp. (figure 19)

Egalement isolée à partir d'une culture des Gambier, de très petite taille (5 à 8 microns), très mobile grâce à deux longs flagellés ; division binaire longitudinale ; aspect jaunâtre des cultures.

CHROCOCCOPSIS sp. I et II (figure 19)

Ce sont des Cyanophycées coccoïdes, le thalle est lâche, non gélifié, seules la taille moyenne et la coloration les différencient : I plus petit que II ; I gris-verdâtre alors que II est d'un vert lumineux ; la multiplication se fait par microspores, ce sont des polluants redoutables des cultures d'algues.

4.3. Commentaires

Les résultats précédents joints à ceux de la biochimie appellent quelques commentaires.

Parmi les algues cultivées la recherche d'une fraction toxique liposoluble s'est avérée positive :

- chez Diplopsalis "gros" (environ 1000 US pour 820 000 cellules)
- chez Exuviella sp. (environ 2000 US pour 200×10^6 cellules)
- chez Chroococcopsis sp. (environ 1500 US pour 2 L de culture)
- chez Diplopsalis "petit" dans une moindre proportion (2000 US pour $6,4 \times 10^6$ cell et 1000 US pour 28×10^6 cellules).

La fraction toxique hydrosoluble est mise en évidence :

- chez Diplopsalis "gros" (3800 US pour 820 000 cellules)
- chez Diplopsalis "petit" (7500 US pour $6,4 \times 10^6$ et 700 US pour 28×10^6 cellules)
- chez Exuviella (1000 US pour 200×10^6 cellules)
- et dans une très faible mesure chez Amphidinium I et II.

On remarque donc :

- que peu d'espèces sont toxinoproductrices même dans le groupe des Dinoflagellés,

- que chez *Diplopsalis* les deux souches dites petites et grosses sont vraiment très différentes sur le plan toxinoproduteur,

- que des cultures identiques de *Diplopsalis* produisent des quantités variables de toxine hydrosoluble,

- que deux espèces très voisines de Cyanophycées sont différentes sur le plan toxique,

- qu'*Exuviella*, espèce assez répandue en Polynésie et même susceptible d'efflorescence dans les lagons produit une toxine liposoluble.

Cette étude préliminaire ne fait que poser de nouveaux problèmes :

- authenticité de la parenté *Diplo* petit - *Diplo* gros,
 - influence des bactéries associées à la culture de *Diplopsalis* "petit" sur la fabrication de toxine.

- rôle des nutriments organiques sur cette production,
 - existence d'un élément déclenchant la production de toxine chez *Diplopsalis* (d'où cultures axéniques, milieu différent de celui de Provasoli (ES1))

- enfin nécessité de compléter l'étude écologique des revêtements algaux toxiques notamment de la microflore en recherchant les espèces indicatrices de la niche *Diplopsalis* mais aussi les autres espèces participant éventuellement à la fabrication de ciguatoxine et de maïtotoxine.

5 - TRAVAUX IMMUNOLOGIQUES

Etudes préliminaires de détection immunologique de la ciguatoxine dans les échantillons biologiques à l'Institut Malardé.

sur/ Les communications du Professeur HOKAMA à la dernière réunion du Comité d'Experts/la détection immunologique directe de la ciguatoxine dans les échantillons pisciaires, puis les Dinoflagellés, ont à juste titre suscité le plus vif intérêt. Dans ses conclusions de Février 1977 le Comité, mentionnant que le test doit constituer à brève échéance un outil maniable de travail sur le terrain, recommandait des études complémentaires de sensibilité et fiabilité par des échanges entre Tahiti et Hawaï de nombreux échantillons testés parallèlement selon les méthodes traditionnelles biologiques (chat et souris) et la radioimmunologie directe.

au / L'analyse corrélative avec le test chat auquel nous accordons une fiabilité/ moins comparable au test mangouste n'a pas donné les résultats escomptés et entraîné dans un deuxième temps l'Institut Malardé à entreprendre divers protocoles de réalisation d'immuns sérums spécifiques ayant nécessité des études préliminaires importantes.

5.1. Analyse corrélative modulée des tests chat et souris

5.1.1. Introduction

L'appréciation quantitative du test chat (comme tout test de ce type) est difficile et l'on peut discuter les critères plus ou moins subjectifs de l'évaluation. Cependant la reproductibilité et la fiabilité augmentent considérablement avec l'expérience, ce qui est le cas à l'Institut. On peut affirmer que tous les poissons ayant donné un niveau d'intoxication évalué T 3 sont impropres à la consommation et doivent impérativement être écartés par un test jugé fiable.

ECHELLE D'APPRECIATION DE LA TOXICITE CHAT

DEGRE	SIGNIFICATION
T. 1	Aucun symptôme
T. 2	Diminution de l'activité générale
T. 3	Ataxie d'un membre
T. 4	Ataxie d'un train
T. 5	Ataxie et parésie des deux trains
T. 6	Mort

NOTA: pour effectuer les calculs statistiques
la côte habituelle T_0 à T_5 a été remplacée par T_1 à T_6 .

Il n'a pas été tenu compte dans l'exploitation des diverses données du nombre de repas (accumulation ou non), car les échantillons atoxiques ont toujours été absorbés à deux reprises par l'animal.

5.1.2. Comparaison des niveaux toxiques par test chat et détermination radio immunologique.

La première appréciation est visualisée sur la figure 20 ou en abscisse sont portés les degrés d'intoxication et en ordonné les coups par minute (c/m). La dispersion en niveaux cpm, le chevauchement de ceux-ci lorsqu'il s'agit d'échantillons toxiques et atoxiques démontrent déjà l'impossibilité d'utiliser en pratique la détection par le sérum anticiguatoxique de mouton préparé par le Pr HOKAMA, même marqué à l'iode 125.

Les calculs statistiques présentent néanmoins des valeurs significatives puisque r est à 0,24 mais la pente de la droite de régression est très faible 15,83 - plus ou moins 7,20 objectivant un écart type considérable.

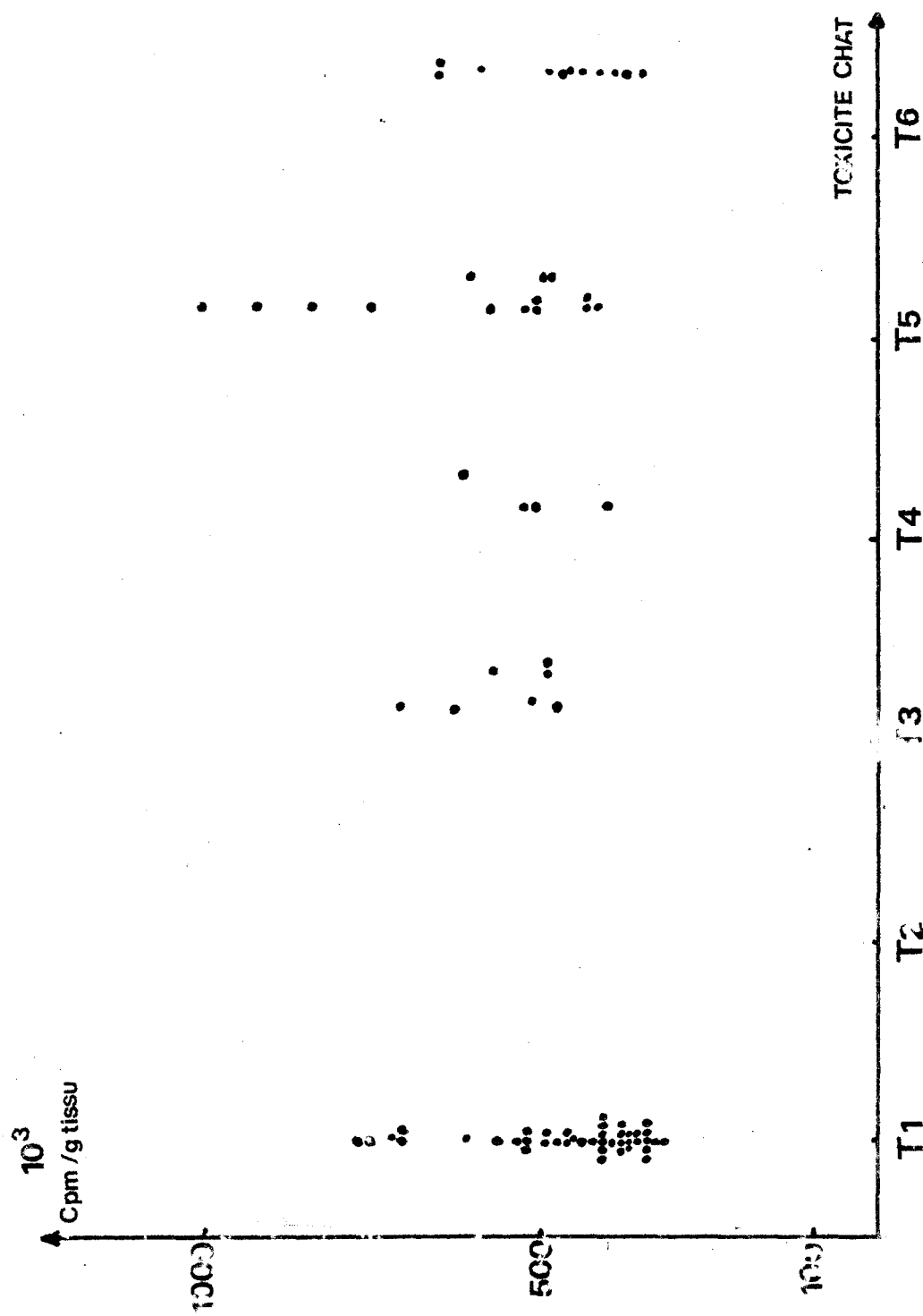


FIGURE 20

Un diagramme comparable en tenant compte que des manifestations pathologiques apparues dans les 48 (quarante huit) premières heures est porté sur la figure 21. Les valeurs statistiques sont légèrement meilleures puisque $r = 0,34$ avec y supérieur à 1%. Il n'en demeure pas moins que seuls deux échantillons T 5 ont un niveau supérieur à celui du maximum obtenu par T 1.

La figure 22 représente les phénomènes pathologiques majeurs observés le premier jour (T 5). (Aucun décès n'a été observé dans les 24 premières heures).

Dans la figure 23 les intoxications majeures T 5 et T 6 des quarante huit premières heures sont comparées. La corrélation est ici négative $r = - 0,28....$

Sans présumer ou non de la présence d'anticorps anticiguatoxine dans le sérum employé cette analyse corrélative au test chat montre que 80 % de poissons sains devraient être éliminés pour obtenir une possibilité de ne pas livrer à la consommation des spécimens dangereux.

5.1.3. Etude corrélative de même type que la précédente effectuée sur des lots pisciaires de même espèce.

A - PERROQUETS
=====

Les résultats obtenus avec le sérum de lapin de l'Institut de Recherches Médicales Louis Malardé sont signalés pour mémoire. Malgré son pouvoir antitoxique élevé (cf. plus loin) ce sérum ne renferme pas d'anticorps spécifiques.

On remarque une productibilité très acceptable au niveau de cpm décelé d'une manipulation à l'autre par comparaison des graphiques 3 - 5 et 4 - 6 de la figure 24.

Il apparaît aussi très clairement que le test n'est dans cette manipulation corrélé avec aucun des tests biologiques chat ou souris. Tous les calculs statistiques effectués ont montré une absence de signification de (coefficient de régression).

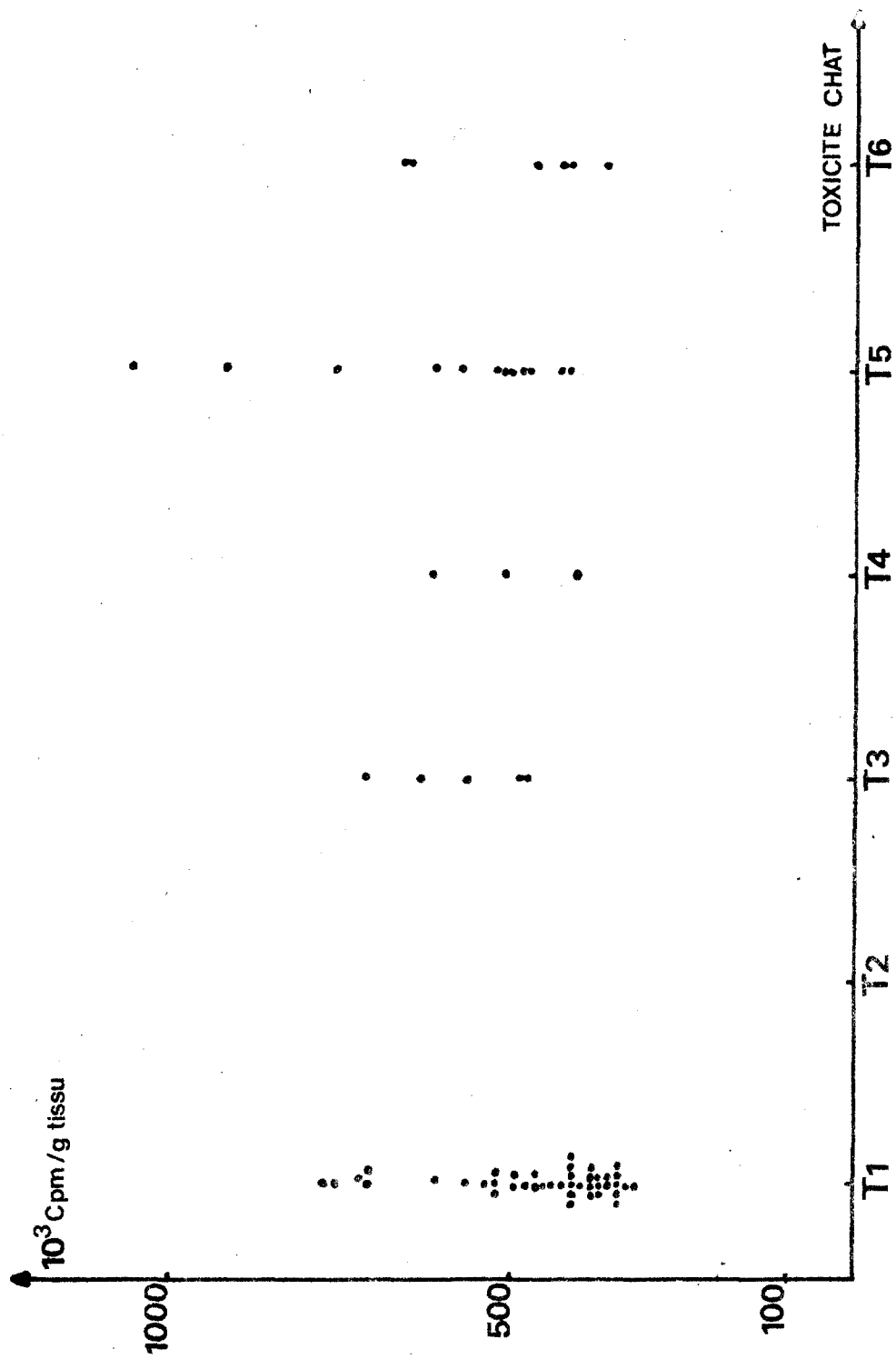


FIGURE 21

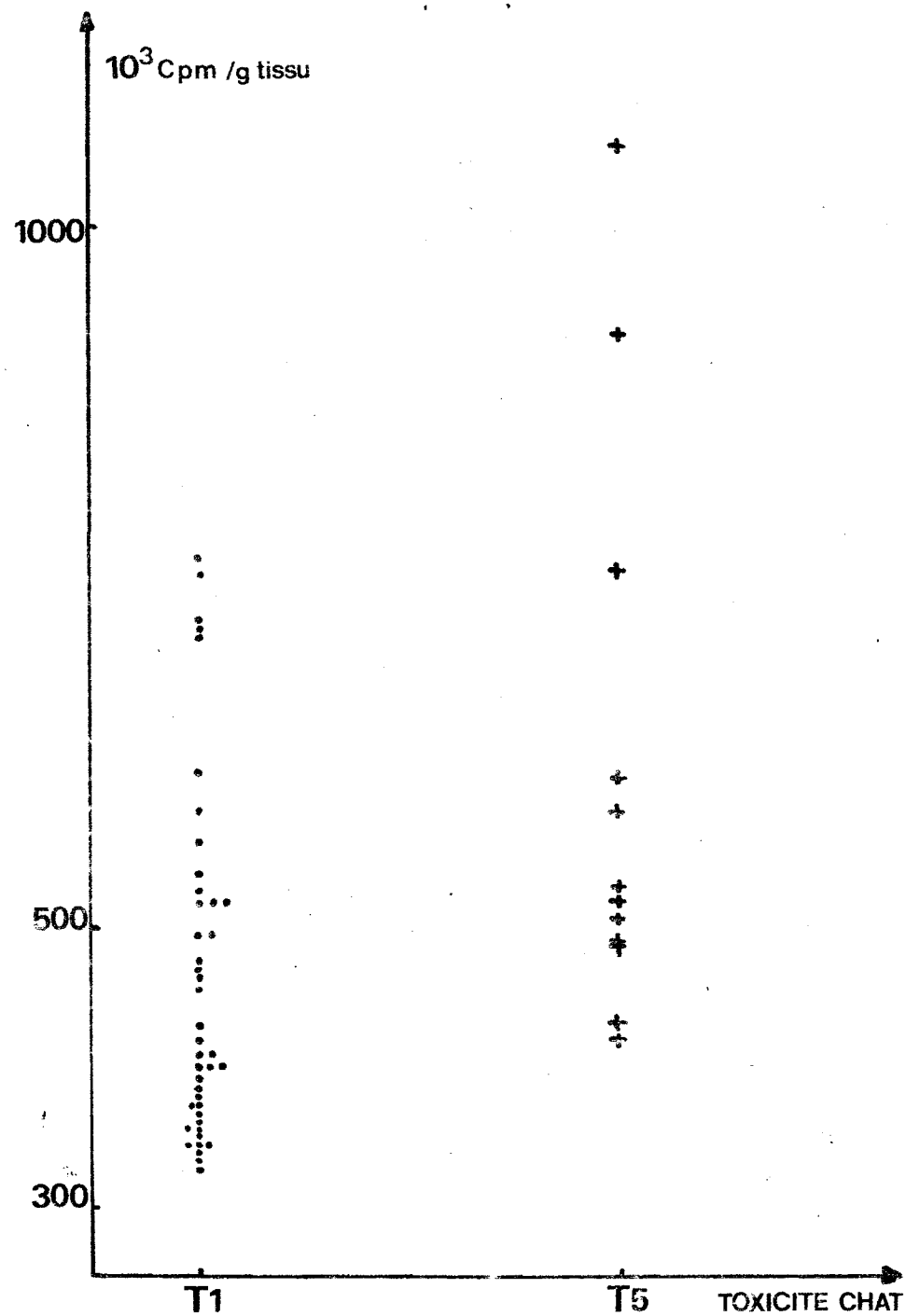


FIGURE 22

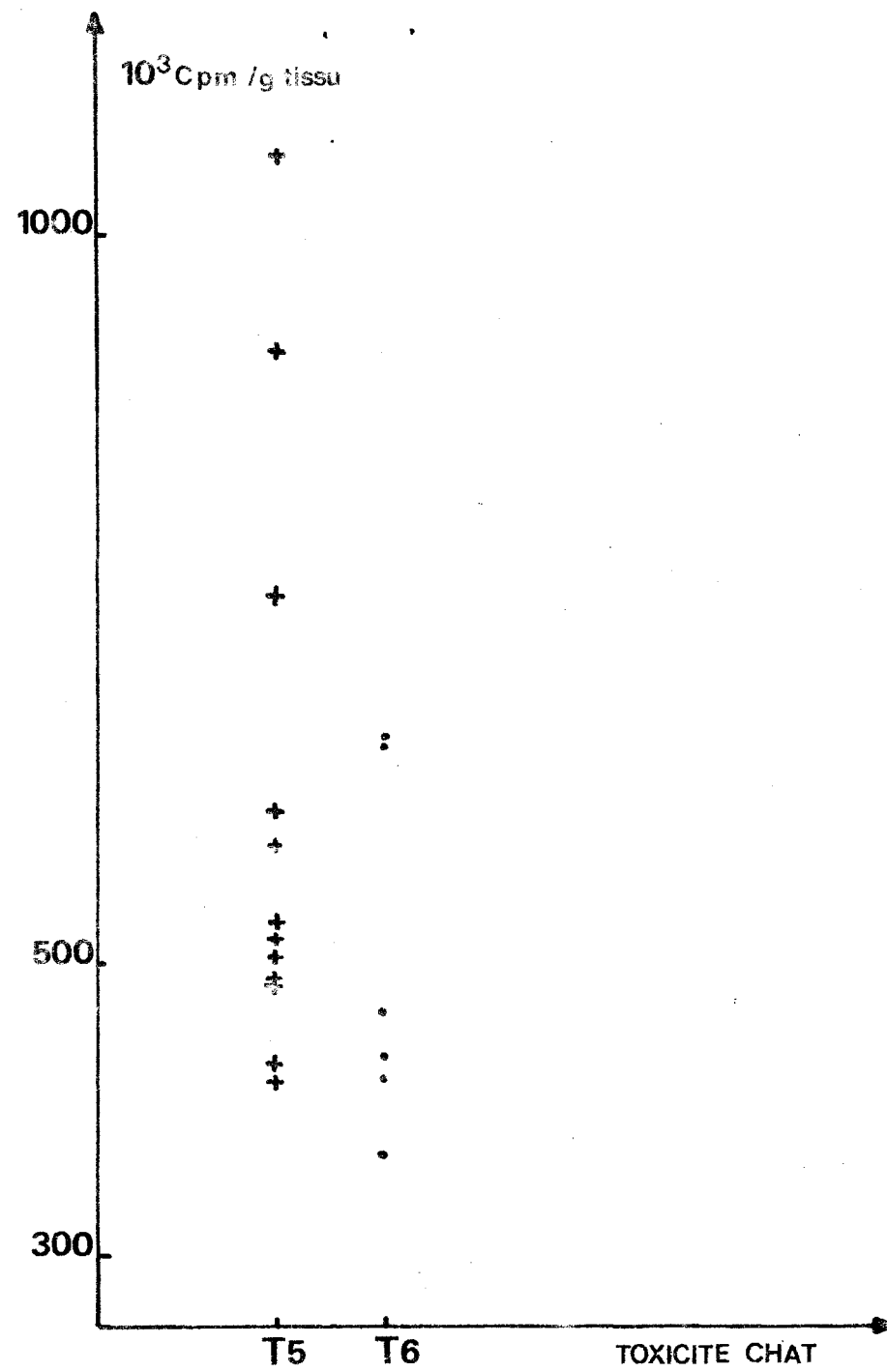
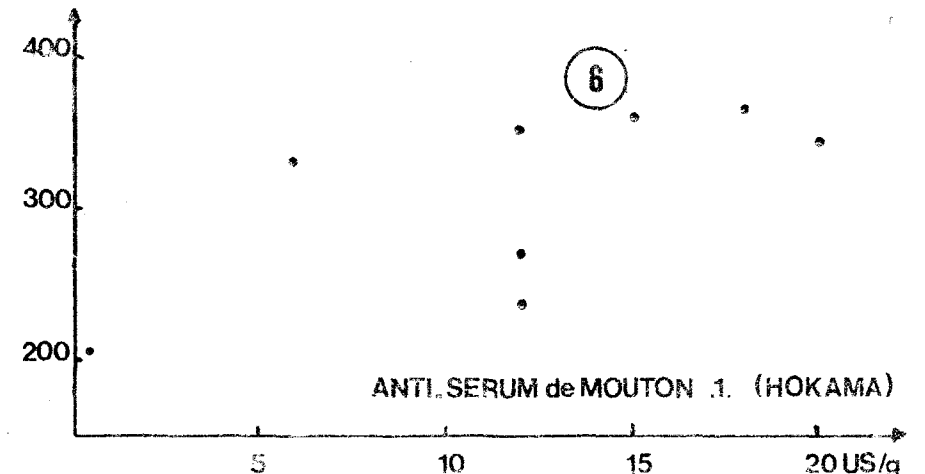
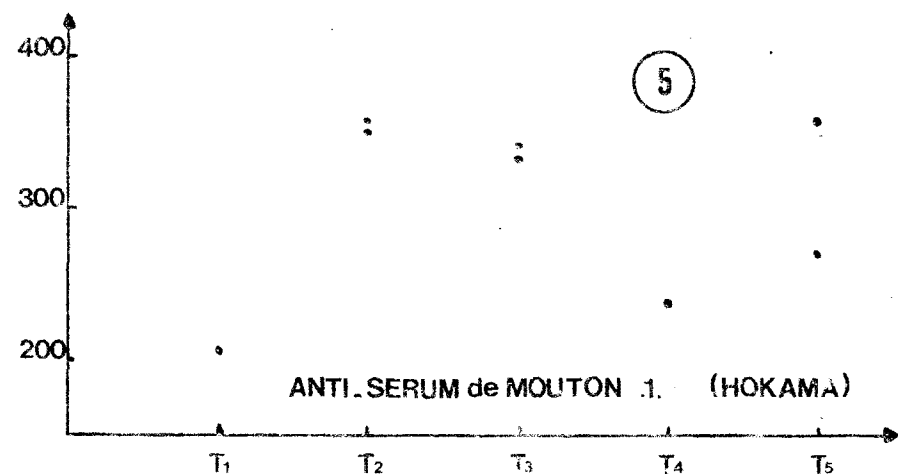
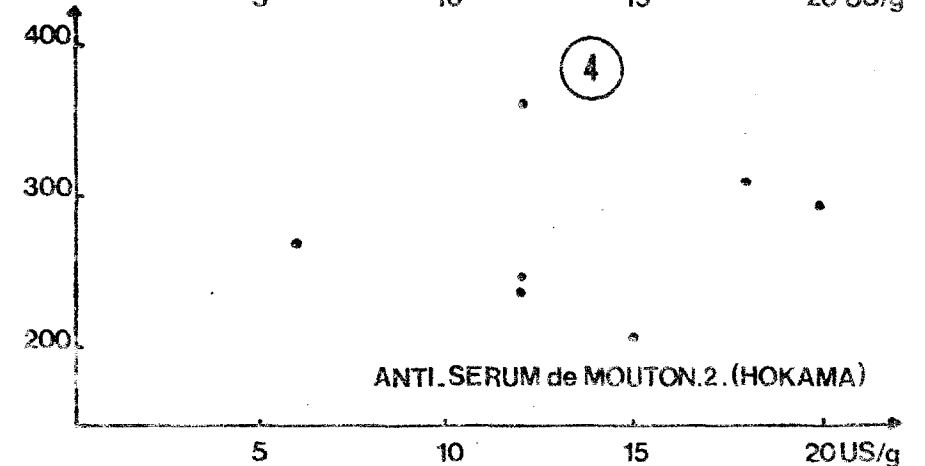
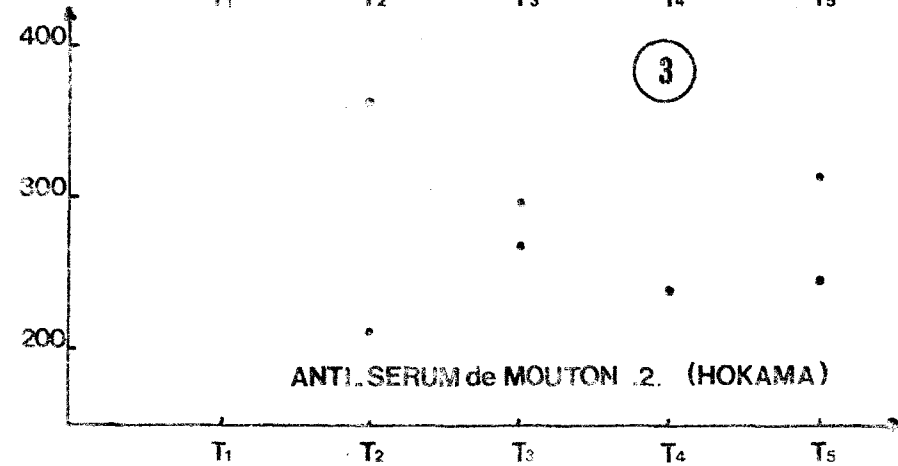
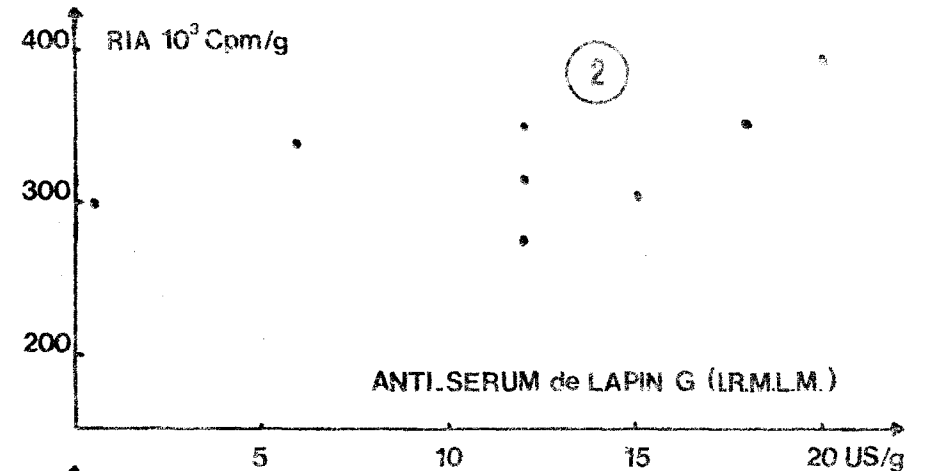
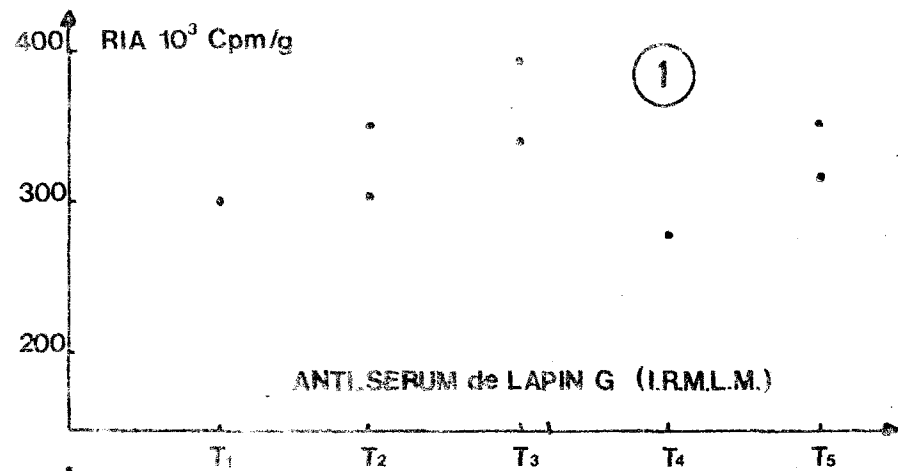


FIGURE 23

Figure 21: POISSONS PERROQUETS



TEST CHAT

TEST SOURIS

Autre constatation importante : l'antisérum de lapin non spécifique présente des écarts de fixation d'un échantillon à l'autre comparable en valeur absolue à ceux obtenus avec l'immun sérum de mouton. Nous reviendrons sur cette adsorption variable par les tissus pisciaires, de diverses gamma globulines en fonction de l'espèce dont proviennent les globulines, de l'espèce pisciaire et de l'organe test.

B - MURENES

La figure 25 objective les résultats obtenus par le même antisérum de mouton radiomarké en présence de chairs de murènes de toxicité croissante. Aucune corrélation n'a été retrouvée.

C - CONCLUSION

Il est certain que le nombre de tests pratiqués dans des échantillons pisciaires homogènes est limité. Il n'en demeure pas moins vrai qu'aucune liaison statistique n'a été trouvée avec les toxicités réelles. Ce premier bilan, à compléter éventuellement entame sérieusement l'espoir de résultats pratiques dans le système considéré même après élimination du bruit de fond (background) propre à chaque espèce pisciaire d'un lieu déterminé.

5.2. Variations de l'activité biologique de la ciguatoxine en présence de diverses globulines sériques

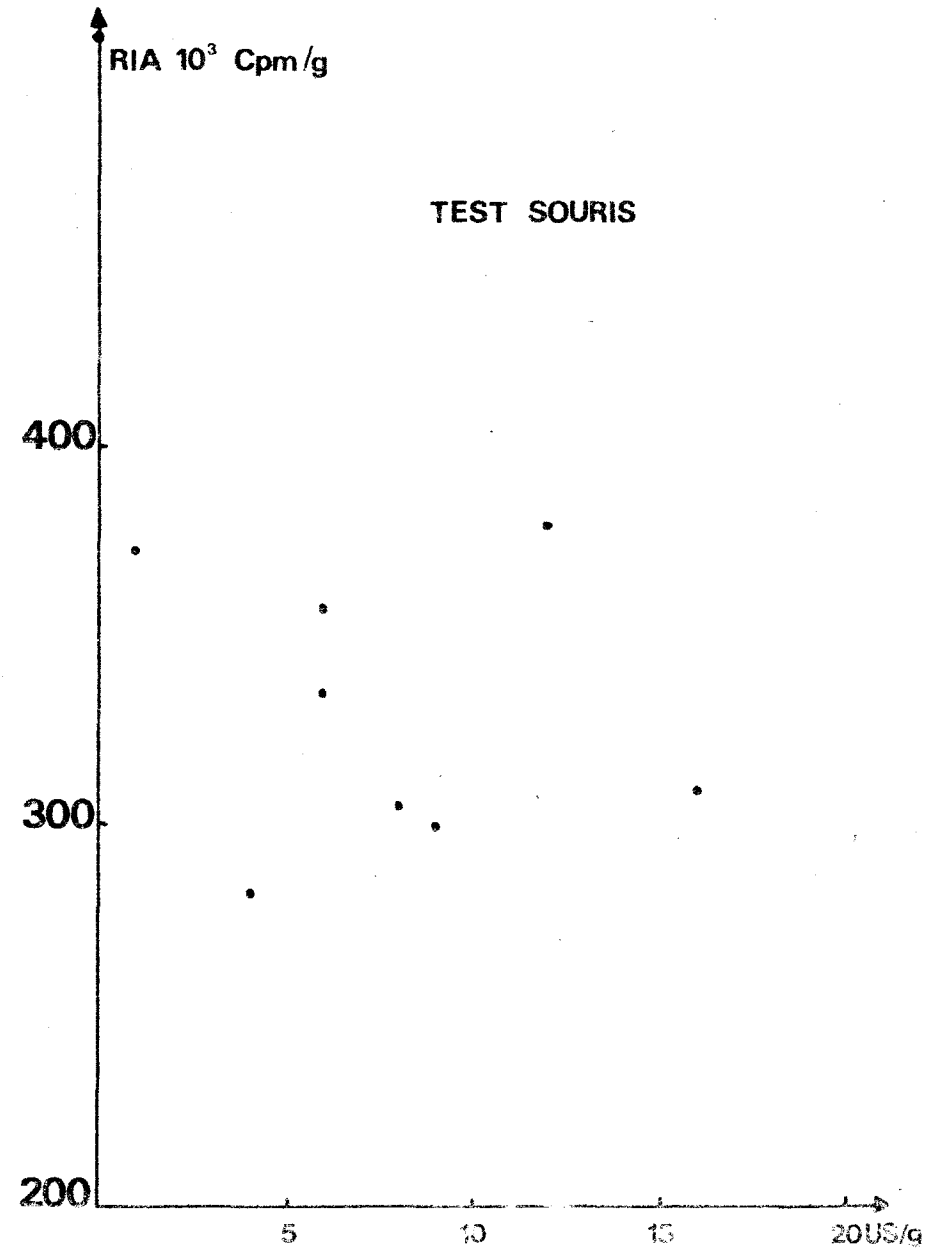
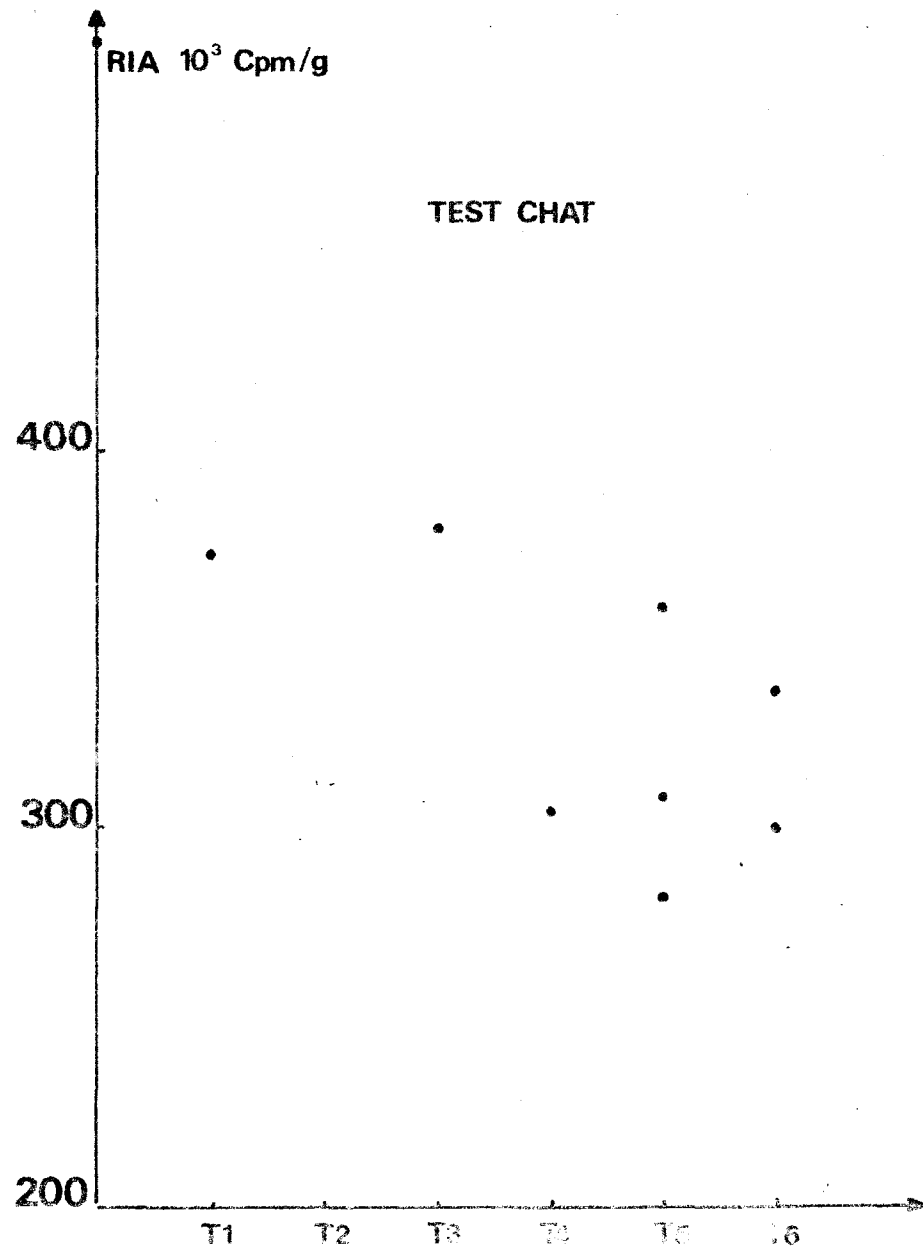
5.2.1. Introduction

La fixation spontanée de la ciguatoxine sur de l'albumine (phénomène observé avec d'autres lipides de faible poids moléculaire) se traduit globalement par une perte de 50 % du pouvoir toxique.

Pour ne pas attribuer à une éventuelle réaction immunitaire spécifique la baisse du pouvoir toxique en présence d'un immun sérum, nous avons entamé l'étude des variations de la toxicité sur souris du complexe CTX-SAH après mise au contact de fractions globuliniques.

Figure 25: MURENES

ANTI-SERUM de MOUTON (HOKAMA)



L'objectif second est la détermination de l'animal le mieux adapté à la production d'anticorps.

TABLEAU 7 : Comportement des sérums totaux des lapins (C + D) et (G) en présence des complexes CTX-SAB et CTX-SAH.

	IM UN- SERUM	133 US/ ml.	PRECI- PITE	TEST SOURIS SUR PRECI- PITE	TEST SOURIS DU SURNAGEANT	NOMBRE DE SOU- RIS INJEC- TES
1	sérum lapin normal 0,75ml	CTX-SAH 0,75ml 100 US.	+	mort > 5h	Aucun survivant 3h 10 < mort < 5h	5
2	lapin C + D 0,75ml	CTX-SAB 0,75ml 100 US	++	mort en 4h30	Une survivante 8h < mort < 10h	5
3	lapin 0,75ml	CTX-SAH 0,75ml 100 US	+	mort > 5h	Deux survivantes 8h < mort < 10h	5
4	lapin C + D 0,75ml	SAH 0,75ml 30mg/ml	+	R.A.S.	Cinq survivan- tes	5

CTX-SAB : ciguatoxine de Tonu - sérum albumine bovine

CTX-SAH : ciguatoxine de Tonu - sérum albumine humaine.

Le protocole général observé a été décrit dans
A radioimmunoassay for the detection of ciguatoxin
(Y. HOKAMA, A.H. BANNER, D.B. BOYLAN) Toxicon 1977, Vol. 15.

5.2.2. Pouvoir antitoxique de sérums de lapin
"hyperimmuns"

A - OBSERVATIONS sur sérum total

Les lapins EC + DE et G ont été immunisés en 1975 à l'Institut Malardé selon le protocole de Coulon et Morelec : injection intraveineuse des mélanges cholestérol 0,02 % + CTX maïto 0,4 % adjoints respectivement à SAH et SAB 0,1 % en eau physiologique. Les résultats biologique sont reportés sur le tableau 7. Le choix du "carrier" hétérologue dans l'immunisation et le complexe testé a pour but de diminuer l'interaction d'éventuels anticorps anti lien dont on connaît l'importance dans les immunisations **antihaptènes**.. A notre connaissance SAB et SAH n'ont pas de sites antigéniques communs.

TABLEAU 8 - Comportement des G des lapins C + D et G en présence des complexes CTX-SAB et CTX-SAH.

TUBES	G/COMPLEXE - 133 US/ml (Vol/Vol)	TEMPS DE 'SURVIE	'SURVIVANT	NOMBRE 'SOURIS 'INJECTÉES
1	G (C + D) n-a CTX-SAB	5h	0	5
2	G (C + D) a CTX-SAB	3h30	0	5
3	G (G) n-a CTX-SAH	2 à 3h 1 à 6h30	1	4
4	G (G) a CTX-SAH	7h	1	4
5	Sérum lapin normal CTX-SAH	5h	1	5
6	Sérum lapin CTX-SAB	3h30	0	5

G (C+D) n-a : gammaglobulines du lapin C+D à concentration normale du sérum non absorbées.

G (C+D) a : gammaglobulines du lapin (C+D) absorbées par un broyat de poisson volant.

G (G) n-a : gammaglobulines de lapin (G) non absorbées

G (G) a : gammaglobulines de lapin (G) absorbées par un broyat de poisson volant.

Comme on le voit l'abaissement du pouvoir toxique est remarquable puisque le sérum du lapin G entraîne un allongement considérable du temps de décès et permet la survie de deux animaux sur cinq.

B - OBSERVATIONS des mêmes sérums après fractionnement des gammaglobulines et absorption.

Les gammaglobulines G ont été purifiées par précipitation au sulfate d'ammonium et ramenées après dialyse à leur volume sérique initial. Le test souris a été pratiqué avant et après absorption de ces gammaglobulines par un broyat de poisson volant, toujours atoxique.

Cette absorption diminue considérablement ou efface le pouvoir antitoxique comme objective sur le tableau 8.

Nous n'avons aucune preuve de l'existence de ces sites. Si le sérum contenait des anticorps spécifiques cette absorption par le "poisson volant" sous entendrait un caractère ubiquitaire des sites antigéniques ciguatoxiques dans les chairs de poissons marins.

La protection a plutôt toutes chances de n'avoir aucun support immunologique. Une interaction biochimique non spécifique entre les globulines et le complexe CTX-SAH est plus vraisemblable.

TABLEAU 9 : Concentration en gammaglobulines de divers sérums de lapin.

LAPIN	MELANGES IMMUNISANTS	GAMMAGLOBULINES mg/ml de sérum
Normal		0,7
T1	CTX-maito 0,4 %	1,61
T2	Cholestérol 0,02 %-SAH 0,1%	1,46
T3	Cholestérol 0,02% - SAB 0,1% - Poisson volant : 0,4%	0,93
Arlette	Cholestérol 0,02%-SAB 0,1% - CTX maito 0,4%	7
Brigitte	Cholestérol 0,02 % - SAB 0,1 % - CTX maito 0,4%	6,4
Norma	Cholestérol 0,02 % - SAB 0,1 % CTX maito 0,4%	0,94

C - Variations du taux de gammaglobulines chez les lapins immunisés.

Les résultats précédents nous ont fait procéder à l'immunisation d'autres lapins selon le même protocole. Le tableau 9 montre les différents mélanges immunisants témoins négatifs employés et surtout les grandes variations du taux de gammaglobulines retrouvées. Le pouvoir antitoxique peut simplement être sous tendu par cette variation quantitative.

5.2.3 Pouvoir antitoxique du sérum de lapin et d'autres protéines en présence du complexe DCTX - SAH (CTX extraite de *Diplopsalis* sauvage).

Le tableau 10 montre une activité antitoxique générale à concentration élevée des gammaglobulines normales humaines ou de lapin.

Sur le tableau 11 le pouvoir antitoxique du sérum hyperimmun "Arlette" est augmenté de manière significative par rapport au sérum de lapin normal. et autres globulines à concentration égale.

Pour être interprétée cette expérience doit être renouvelée. Cependant le sérum G qui avait des caractéristiques antitoxiques comparables, était dépourvu de toute activité immunologique spécifique anticiguatoxique après marquage à l'iode 125 (cf. figure 24 et la figure 26 où aucune corrélation ne peut être envisagée entre tests biologiques et résultats immunologiques).

5.2.4. Conclusion

Ces diverses expériences montrent la complexité des rapports entre la ciguatoxine et les gammaglobulines. Elles prouvent que la présence d'un pouvoir antitoxique ne signifie pas anticorps spécifiques dans ce système. La ciguatoxine complexée se lie encore aisément à d'autres protéines avec des affinités variables. Ceci doit nous amener à une grande circonspection dans l'interprétation de résultats d'allure encourageante obtenus in vitro.

Figure 26: MURENES

ANTI-SERUM de LAPIN G (I.R.M.L.M.)

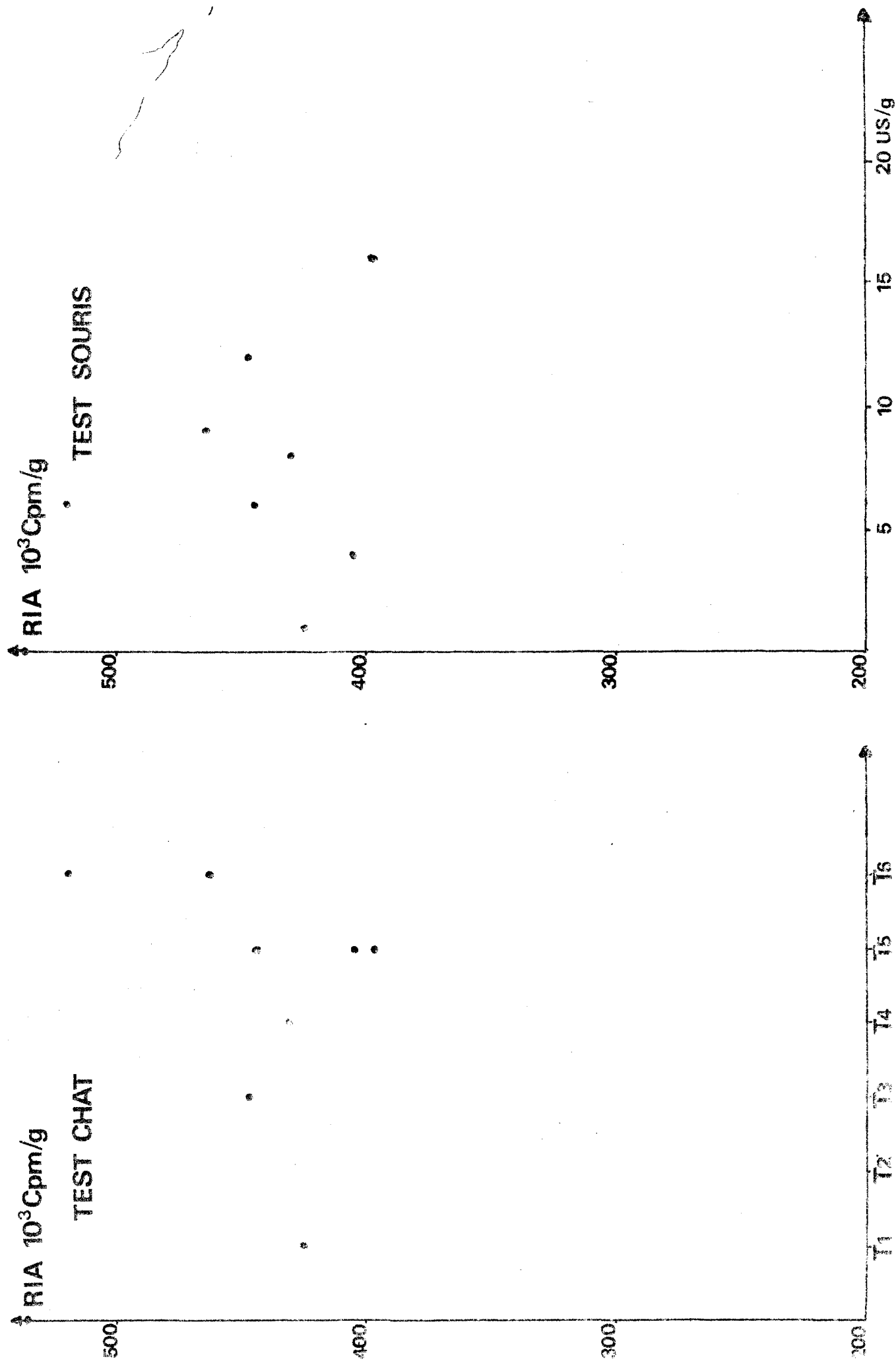


TABLEAU 10 : Gammaglobulines de lapin normal et
Gammaglobulines humaines (Ig Diamant)
en présence du complexe DCTX-SAH.

GAMMAGLOBULINES LAPIN NORMAL	TOXICITE DU SURNA- GEANT %	TOXICITE DU CULOT %	TOXICITE MANQUANTE %	VOLUME REACTION- NEL ml
0,25mg/ml + DCTX-SAH (43 US/ml)	21	24	55	2
0,125 mg/ml + DCTX-SAH	48	14	38	"
0,05mg/ml + DCTX-SAH	60	20	20	"
0,025mg/ml + DCTX-SAH	76	24	0	"
Gammaglobulines humaines Diamant	%	%	%	ml
0,25mg/ml + DCTX-SAH	65	19	16	2
0,025mg/ml + DCTX-SAH	88	12	0	"
SAH	%	%	%	ml
0,025mg/ml + DCTX-SAH 2ml (86 US)	80	20	0	2

DCTX-SAH : ciguatoxine extraite de *Diplopsalis* sauvage
----- complexe à SAH.

TABLEAU 11 : Gammaglobulines du lapin "immunisé"Arlette"
en présence de DCTX-SAH et CTX-SAH.

GAM AGLOBULINES LAPIN IMMUN. "ARLETTE"	TOXICITE SURNAGEANT	TOXICITE CULOT	TOXICITE MANQUANTE	VOLUME REACTION- NEL ml
	%	%	%	
0,025 mg/ml + DCTX-SAH	52	14	34	2
0,025mg/ml + CTX-SAH	55	28	16	2
Gammaglobulines lapin normal				
0,025mg/ml + DCTX-SAH	76	24	0	2
Gammaglobulines humaines				
0,025mg/ml + DCTX-SAH	88	12	0	2
SAH				
0,025mg/ml + DCTX-SAH	80	20	0	2

5.3. Expériences d'immunofluorescence

Le tableau 12 résume parfaitement notre expérience de cette technique depuis Février 1977. Les chairs de poisson marin présentent une fluorescence non spécifique variable d'aspect et peut être d'intensité avec l'histologie elle même très variable d'une espèce à l'autre.

L'absorption par le broyat de poisson volant atoxique éteint cette fluorescence dans la même espèce et la diminue considérablement dans les autres (en particulier les murènes). Cette absorption ne permet pas de révéler une toxicité sur un autre échantillon grâce aux anticorps restants.

Nous rapprocherons ce phénomène de l'absorption du pouvoir antitoxique du sérum de lapin par le même broyat de poisson volant.

Les foies ne présentent pas ce phénomène d'adsorption non spécifique des immunoglobulines, tout au moins au niveau des hépatocytes, que ceux ci soient très toxiques ou non. Malheureusement les vaisseaux sanguins et les canaux biliaires fluorescent fortement rendant l'emploi de cet organe aléatoire pour la détection directe à moins de disposer d'un antiserum hautement spécifique et de titre élevé. La fixation réduite des immunoglobulines au niveau du foie est d'ailleurs corrélée avec les chiffres très bas de "cpm" obtenus sur le foie de murène lors de l'emploi de l'antisérum de mouton radiomarké.

Les Dinoflagellés toxiques ou non ne présentent jamais la moindre fluorescence avec les divers sérums employés. Les artefacts sont nombreux sur ce genre de prélèvements mais à notre avis une éventuelle fluorescence devrait logiquement être protoplasmique et non pariétale.

Nous savons en effet la nature exclusivement cellulosique de celle-ci et la production de ciguatoxine à ce niveau nous paraît improbable.

TABLEAU 12 : IMMUNOÉLOMENTENCE DIRECTE SUR ÉCHANTILLONS BIOLOGIQUES DE TOXICITÉ CONNUE.

POISSONS, DINOFLA- CELLES	TOXICITE CHAT	TOXICITE SOURIS	SERUM MOUTON HOKANA	SERUM MOUTON HOKANA	SERUM MOUTON NORMAL	SERUM LA- PIN VERNOUX	SERUM LA- PIN NORMAL	SERUM LA- SOURIS NORMAL	SERUM POULE NORMAL
Chair de poisson volant	T1	0,5 US/g	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++
Chair de murène	T6	9 US/g	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++
Chair de murène	T6	6 US/g	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++
Chair de murène	T1	1 US/g	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++
Foie de tsaréna	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Foie de murène B 965	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Foie de murène B 969	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Foie de murène B 971	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Péridinien Hitiaa H	-	atoxique	-	-	-	-	-	-	-
Diplo-salis sauvage	-	0,2 US/ 1000	-	-	-	-	-	-	-
Diplop-salis de culture	-	atoxique	-	-	-	-	-	-	-

5.4. Conclusions générales

Les sérums dont nous disposons à ce jour ne permettent pas la réalisation d'un test fiable quel que soit le marqueur employé. Nous sommes pessimiste sur l'obtention à court terme d'un antisérum valable. Nous pensons en effet que :

5.4.1. Les inconnues sur la structure biochimique de la toxine sont trop nombreuses.

5.4.2. L'impossibilité d'obtenir la toxine pure conduit à des tentatives d'immunisation par un complexe lipidique toxique où la part relative des contaminants et des molécules de ciguatoxine est inconnue. Ces contaminants sont très vraisemblablement des radicaux constituants normaux du poisson.

5.4.3. La fixation non spécifique des immoglobulines sur les tissus musculaires pisciaires, gêne considérablement l'emploi d'un éventuel sérum antitoxique d'autant plus que cette fixation varie d'un échantillon à l'autre.

Nous avons entamé :

- Une nouvelle approche du problème grâce à l'obtention de ciguatoxine provenant de *Diplopsalis* sauvage. Nous avons commencé la réalisation d'immunes-ascites de souris qui ont l'avantage de donner des anticorps à titre élevé et de grande spécificité. La conjugaison de l'extrait à la SAB a déjà été réalisée après fixation d'un radical succinyl à la ciguatoxine pour rendre possible l'action de conjugaison de la carbodiimide.

L'emploi parallèle d'un test négatif comportant le même échantillon pisciaire et un second conjugué de souris présentant les mêmes caractéristiques iode-protéïnes peut faire avancer la solution du problème, d'autant plus que l'éloignement dans la systématique des *Dino-flagellés* et des poissons peut laisser espérer l'élimination des réactions croisées par les contaminants de l'extrait.

Une seconde voie d'approche peut être la maïto-toxine où il est possible qu'une molécule proche de la ciguatoxine soit déjà liée à la protéine "carrier".

Nous terminerons en insistant sur l'intérêt d'étudier plus avant l'hypersensibilité chez l'homme. Certaines données prometteuses ont été recueillies mais elles sont encore trop fragmentaires pour être exposées dans ce rapport.

6 - ASPECT PHARMACOLOGIQUE

6.1. Introduction

Certains médicaments peuvent retarder le temps léthal de souris intoxiquées par injection intrapéritonéale d'un résidu méthanolique de Scarus gibbus (Rüppel) ou même avoir un effet protecteur. Le principe de ces études pharmacologiques consiste donc à cerner le plus finement possible l'action de ces médicaments et à déterminer les doses les plus efficaces sur l'animal.

6.2. Méthodes

L'évaluation de l'action des médicaments choisis est faite sur des lots de cinq souris de 18 à 20g. Il y a donc cinq souris témoins et des lots de cinq souris expérimentales. Ces lots se différencient par la différence de temps (Δt) entre l'injection de la toxine et celle des médicaments. Ainsi nous avons fait cinq lots répartis comme suit :

- lot 1 : souris ayant reçu le médicament en même temps que l'injection de la toxine,
- lot 2 : injection du médicament 1/2 heure après la toxine,
- lot 3 : injection du médicament 1 heure après la toxine,
- lot 4 : injection du médicament 1H 1/2 après la toxine,
- lot 5 : injection du médicament 2H après la toxine.

Les différentes approches d'une DLM-8H nous ont révélé la difficulté d'apprécier efficacement et d'une façon constante une valeur précise de DLM, au-delà de 5H. C'est pourquoi, après une dizaine d'essais nous avons déterminé une DLM 3H pour un résidu méthanolique de Scarus gibbus (Rüppel).

6.3. Médicaments et vitamines utilisés

- Diparcol (diéthazine)
- Glutamate de Calcium

- Glutamate de Ca++ + Vitamine B₁
- Vitamine B₁
- Glutamate de Ca ++ + Vitamine B₆
- Glutamate de Ca ++ + Vitamine B₁ (x 2)
- Vitamine B₁₂
- Glutamate de Ca ++ + Vitamine B₁₂
- Glutamate de Ca ++ + Dibencozan
- Vitamines B₁ + B₁₂ (x 2).

6.4. Résultats et discussion

Les expérimentations réalisées ont confirmé que l'appréciation des effets d'un médicament sur l'animal entier est délicate. Délicat du fait de l'extrait injecté et du fait de l'animal lui-même. En effet, l'idéal pour apprécier l'action d'un médicament est que la toxine utilisée puisse avoir une DLM fiable aux environs de 8H pour permettre au médicament d'avoir le temps d'agir efficacement. Dans toutes nos expérimentations les premières souris témoins décédaient vers + 2H ce qui est beaucoup trop rapproché du temps d'injection pour nous permettre d'interpréter efficacement les résultats. Le second point est l'extrême variabilité des réactions de l'animal entier aux diverses drogues ou médicaments utilisés.

Malgré ces réserves, il y a synergie dans la protection du Glutamate de calcium associé à la vitamine B₁. Les doses utilisées sont certainement à affiner mais déjà le glutamate de Ca ++ à la dose de 40mg/kg et la vitamine B₁ à la dose de 5mg/kg laissent entrevoir de réelles possibilités. (figures 27 et 28).

Les autres associations n'ont pas donné de résultats dignes d'intérêts aux concentrations et doses utilisées.

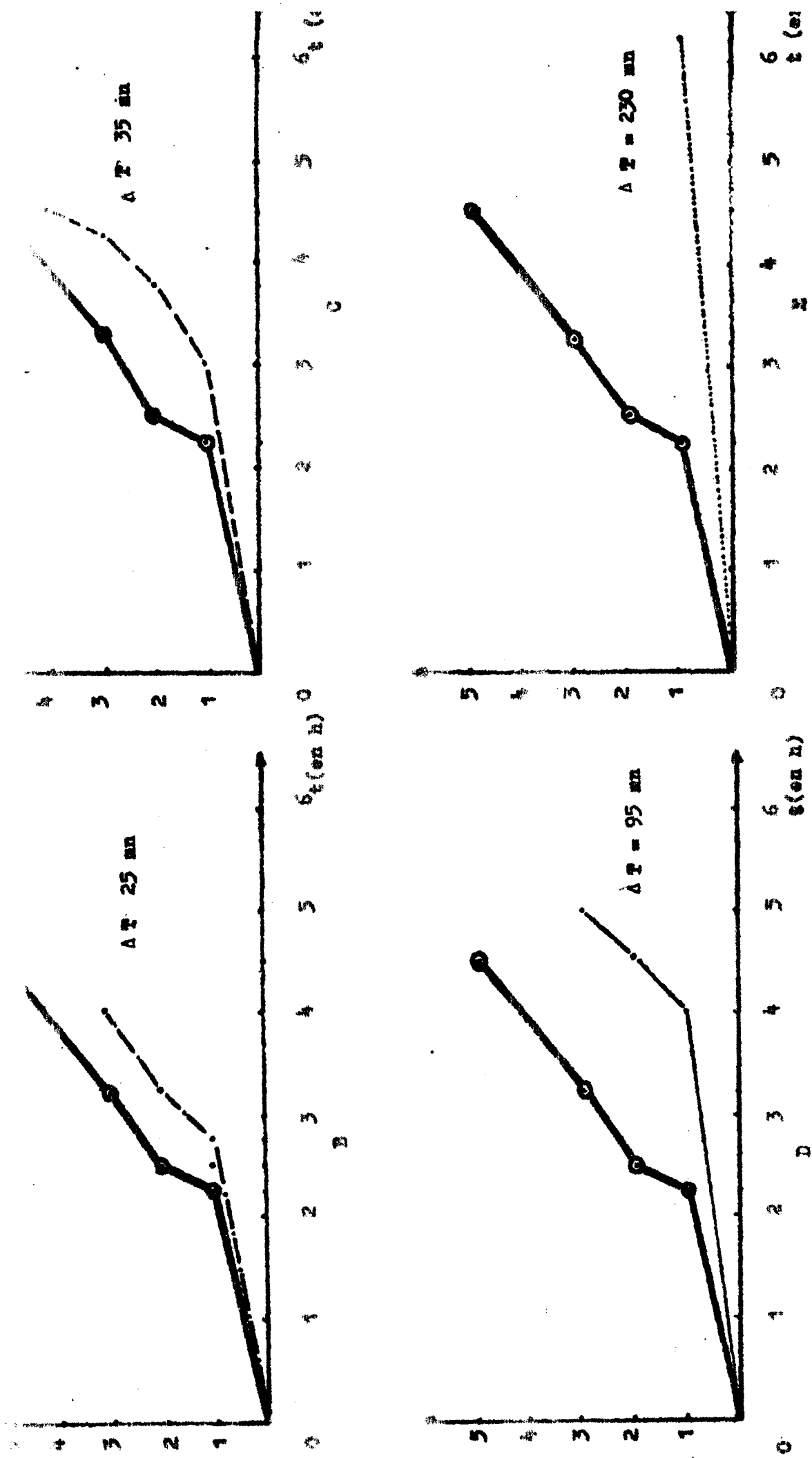


FIG. 27 d 28 : Rapport courbe témoin et tests : $(\ln l/2 - \ln) - (1/2h - \ln)$ - en même temps