RAPPORT POUR LA

COMMISSION PACIFIQUE SUD

"Études microbiologiques sur la Ciguatera en Polynésie Française,
Août, 1975"

Docteur L. R. BERGER, Département de Microbiologie, Université de
Hawaii, Honolulu

Dates de l'étude: 3 Aout au 24 Aout, 1975

Personnel: Dr. L. R. BERGER, Professeur de Microbiologie, Université de Hawaii, Roy OHYE, Epidémiologiste en congé du Service de Santé, Etat de Hawaii, Scott KELLOGG, Assistant en Microbiologie.

Lieu des travaux: Notre travail s'est effectuée à l'institut de Recherches Médicales Louis Malardé (IRMLM), Papeete, Tahiti.

But du travail: Le but de cette étude était d'isoler l'agent étiologique de la Ciguatera.

Principe: Pour obtenir et maintenir en cultures pures des microorganismes incluant levures, bactéries, algues, et virus provenant d'eau de lagon, des corraux, et aussi de surfaces récifales, et des contenus stomacaux et intestinaux de poissons.

Remerciements: L'aide et la coopération du Dr. J. LAIGRET, Directeur de l'IRMLM et de son personnel et la collaboration des Docteurs R. BAGNIS et H. KAEUFFER et de Jack BENNETT sont reconnues et bien appréciées. En outre nous remercions Dr. A. H. BANNER qui coordonne les projets ciguateriques à l'Université de Hawaii, les Docteurs P. SCHEUER et D. BOYLAN pour les extraits bruts de ciguatoxine, et le Docteur HOKAMA pour la préparation des sérums anticiguatoxiques.

Subventions: Ce projet était subventionné par la Commission du Pacifique Sud, et en partie par, Sea Grant et le Département de Microbiologie, Université de Hawaii.

Dans ce rapport préliminaire nous inclurons les détails de methodologie et la technique employée. Les lecteurs pourront nous communiquer tout suggestions qui pourraient aider à la solution de ce problème.

Lieux des prélèvements: Sur la recommandation de Dr. Bagnis de l'IRMLM trois lieux de prélèvement ont été choisis à Tahiti. Quatre autres lieux furent personnellement investigués par les Docteurs Bagnis et Kaeuffer et par Jack Bennett. En effet ces endroits ne sont pas accessibles aux étrangers. Le tableau I montre l'emplacement des prélèvements. Une estimation qualitative de la toxicité de chaque site a été faite.

TABLEAU UN

<u>Site</u>	<u>Ile</u>	<u>Endroit</u>
A	TAHITI	Mahaena, environ 100 m ouest du Motu Taupiti*
B	TAHITI	Papara, passe Avaiti*
C,D	HAO	Passe Kaki **
E	TAHITI	Punaauia, Passe Paea ~~III~~ ***
F	MANGAREVA	Passe de l'ouest, cote de Taravai ~~III~~ **
G	MANGAREVA	Aukena **

* Poissons de toxicité moyenne; extraits susceptibles de tuer les jennes chats.

** La toxicité des poissons dans ces endroits est haute; Le niveau de toxicité a été estimé de 30 à 40 fois supérieure à celle des endroits choisis à Tahiti.

*** Les poissons de cet endroit peuvent être mangés sans danger pour les consommateurs.

Isolements. Plusieurs techniques ont été employées pour l'isolement des microorganismes.

- a. isolement sur milieux banals .
- b. isolement sur milieux sélectifs et différentiels .
- c. enrichissements à partir des premiers isolements.
- d. récolte d'organismes sur lames de verre immergées dans le lagon .

Les poissons étaient placés dans des sacs en plastique individuels aussitôt qu'ils étaient pêchés au fusil ou au filet et transportés dans de la glace. Les techniques d'isolement ont été pratiquées au laboratoire après la capture des spécimens. Cette technique nous a permis ^{dans une} certaine mesure de conserver le maximum de microorganismes sensibles au froid. C'était certainement le cas des échantillons récupérés à Hao et à Mangareva; ils étant très éloignés de Tahiti.

Isolements à partir des poissons: Les échantillons étaient obtenus après ecouvillonnage de la peau des poissons sélectionnés à l'écouvillon stérile. Le ensemencement était fait en stries sur les milieux employés. Voir page 4.

Milieu Un certain nombre ont été sélectionnés. Les milieux classiques ont été utilisés pour obtenir le maximum de microorganismes. Les milieux sélectifs et spécifiques ont été employés pour sélectionner certaines microbes. On a aussi employé les milieux enrichis pour faciliter la pousse de certains microorganismes présents dans le milieu naturel mais qui s'y seraient trouvés en nombre réduit. Les milieux suivants ont été sélectionnés:

Sabouraud-glucose-eau de mer (AM) gelose	McConkey gelose
Sabouraud-glucose-penicilline AM-gelose	Gelose ZoBell
Trypticase-soy-AM-gelose	
Trypticase-soy-glucose (9,1%)-gelose	
TCBS gelose	
BTB-Teepol gelose	
Bouillon sélénite	
milieu d'algue	

Technique de fluorescence: Notre technique utilise l'antisérum dirigé contre les extraits ciguateriques de poissons toxiques. Ces antisérums ont été testés à Tahiti vis à vis de cultures microbiennes. Le manque de temps nous a interdit de tester toutes les souches. Les lames immergées étaient

placées sur un support et plongées dans l'eau du lagon dans une zone réputée toxique. Les lames étaient retirées chaque jour durant une semaine. Ces lames serviront à détecter grâce aux tests d'immunofluorescence les microorganismes adhérents. Nous avons testé ces lames en immunofluorescence pour voir si les microorganismes adhérents réagissaient fortement avec notre conjugué.

L'intestin et l'estomac des poissons étaient mis à nu après dissection stérile de ces derniers. Une petite incision était faite au niveau de l'intestin près de l'extrémité postérieure du tube digestif. Les contenus intestinaux et stomacaux étaient récupérés avec une oese stérile. En ce qui concerne le Mai'to, l'estomac est un organe relativement petit et très musclé. Il peut être détaché facilement de l'intestin. L'estomac est alors lavé à l'eau du robinet et ouvert à l'aide d'un bistouri stérile. En ce qui concerne les poissons qui possèdent un estomac moins musclé, une dissection plus prudente est nécessaire. Si la paroi stomacale est fragile le contenu est récupéré d'une façon identique à celle utilisée pour celle des contenus intestinaux. Les contenus stomacaux et intestinaux étaient ensemencés en stries directement sur les milieux solides. Une première dilution en eau de mer synthétique stérile (75%) était pratiquée. Un aliquot de chaque dilution était alors distribué par les techniques microbiologiques standards dans les milieux liquides.

L'eau et les échantillons de substrats: L'eau de mer des différents sites était récupérée dans des bouteilles de polyéthylène de 500 ml et dans des flacons de 20 ml. L'échantillon "substrat" est le débris récupéré de la surface des récifs. Ils furent récupérés dans des seringues de 60 ml. Ces surfaces récifales étaient celles sur lesquelles les Mai'tos ont l'habitude de se nourrir. L'eau et les échantillons de substrats ont été concentrés sur membranes stériles (0.45 μ m porosite). Les filtres ont alors été placés sur différents milieux nutritifs.

L'isolement des algues, les contenus stomacaux, l'eau, les échantillons de substrat furent inoculés dans un milieu spécifique pour les algues. Ce milieu était distribué dans des tubes pyrex avec bouchons vissés; ces tubes ont été lavés d'une façon très particulière. Ils ont alors été laissés à la température du laboratoire (ca 25°) sous lumière fluorescente ("Plant-Gro" et "Cool-White") d'une intensité d'environ 1000 lux.

5

Repiquage des microorganismes: Chaque boîte qui présentait des colonies isolées fut examinée à l'oeil nu. Les colonies furent sélectionnées en fonction de leurs formes, couleurs, consistances, opacités optiques, leurs tendances à se repandre, la présence de plaques, et tout autre critère. Les colonies isolées ont été alors placées sur le milieu eau de mer-TSA-glucose (0,1%) (bactéries), et sur milieu eau de mer-Sabouraud (levures et champignons). Après que la pousse était évidente les tubes furent tenus à 4° jusqu'au retour à Honolulu. Ils ont alors été maintenus à 12°; en effet différents microorganismes marins sont connus pour leurs fragilités à 4°.

Résultats préliminaires

1. Les cultures microbiennes ont été obtenues à partir de 70 poissons de récif herbivores. Ceci représente approximativement 8 espèces. Les autres cultures proviennent de l'eau de mer récupérée dans les zones toxiques et du matériel solide et semisolide récupérés sur surfaces coralliens et algales habituellement broutées par les poissons de récif. Les échantillons d'eau récupérés ont été ramenés à Honolulu congelés pour la mise en évidence de virus. Des centaines de cultures raménées, environ 5% sont des levures. Sur la quarantaine de cultures algales raménées un certain nombre commence à pousser.
2. On observe qu'après 24 heures d'immersion un film relativement important de bactéries se forme sur les lames immergées. Les échantillons récupérés au jour le jour pendant une semaine et testés en immunofluorescence montraient des microorganismes qui réagissaient très fortement avec notre conjugué. C'étaient exclusivement les bactéries. L'intensité de fluorescence a été plus importante que dans toutes les réactions faites précédemment. Les diatomés et les algues variables ont montré une fluorescence faible avec notre antiserum non-absorbé mais aucune fluorescence avec notre conjugué absorbé contre lipides non-spécifiques de poissons. Il est à noter que nous avons déjà trouvé à Honolulu et à Tahiti en 1969 certaines bactéries qui réagissent avec les préparations anticiguatoxines. Il est trop tôt pour se prononcer sur l'interprétation de telles observations. En effet il est possible que l'extrait de poisson toxique qui a servi à obtenir la toxine et ensuite l'antitoxine contient une proportion non-négligeable d'extrait bactérien pour perturber le test. Une autre hypothèse est que certains microorganismes soient responsables du phénomène ciguatérique.

3. (a) Il nous a semblé qu'il y avait moins d'espèces microbiennes dans les tractus digestifs des poissons capturés à Hao et Mangaréva que dans ceux capturés dans les zones moins toxiques à Tahiti.
- (b) Il est probable que la majeure partie des souches obtenues soit formée essentiellement de Chromobacters, Vibrions, Flavobacters, Pseudomonas, et de souches représentatives de la famille des Enterobactéries. Les souches isolées sur le milieu de McConkey nous ont donné des réactions caractéristiques des Salmonelles. Nous ne savons pas si de tels microorganismes sont fréquents dans le lagon polynésien bien qu'ils soient d'origine terrestre et qu'ils fassent partie de la flore normale des poissons des récifs.

Travail en cours et Perspectives

Nous espérons mener à bien notre étude. Il est à regretter que les travaux entrepris sur le terrain à Tahiti en 1969 n'aient pu être exploités du fait des aléas du programme "Ciguatéra".

Quoiqu'il en soit:

1. Nous lyophilisons actuellement toutes les souches raménées à Honolulu dans le but d'éviter les modifications consécutives aux repiquages. Ce travail représente le conditionnement de 4000 tubes.
2. Toutes les souches isolées seront testées en fluorescence avec notre conjugué anticiguatoxine. Actuellement environ 10% des souches ont été traités.
3. Les bactéries seront typées selon les critères de la bactériologie classique (moderne). Il sera alors procédé à un essai de relation entre les différents types bactériens et leur origine (zone toxique ou poisson toxique). Ce travail demandera l'analyse de quelques 200 caractères phénotypiques par germe.
4. En fonction des résultats obtenus il sera pratiqué des cultures en masse. Ces dernières pourront être utiles dans toutes sortes de recherches en matière de Ciguatéra.
5. Les microorganismes ayant réagi vis à vis de notre conjugué anticiguatoxine pourront être utilisés plus particulièrement en immunologie.

(absorption ...), Ceci devrait permettre une fois pour toute de savoir si les réactions observées sont spécifiques.

6. Il est prévu des expérimentations animales à partir des extraits microbiens. Elles comprendront, entre autre, des études sur la toxicité microbienne, des préparations d'immun-serums qu'il conviendra de comparer aux serums anti-ciguatoxine déjà obtenus.