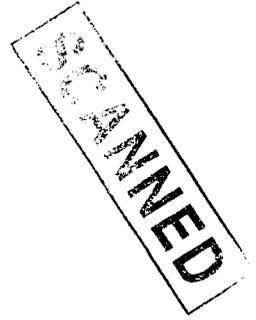


INSTITUT  
DE RECHERCHES MEDICALES  
"LOUIS MALARDE"  
BP. N° 30  
PAPEETE - TAHITI

PAPEETE, le 6 AVRIL 1978

Réf. N° 294/IRM/F.2



=== RAPPORT DE MISSION ===

A

L'UNIVERSITE DE HAWAII DU DOCTEUR FRANCIS PARC

+++++

Prise de contact avec le Professeur HOKAMA du 13  
au 18 Mars 1978 dans le cadre des travaux subven-  
tionnés par la Commission du Pacifique Sud sur  
l'ichtyosarcotoxisme.

-----

I - INTRODUCTION

Le compte rendu final de la réunion du Comité  
d'Experts de l'ichtyosarcotoxisme réuni à Papeete du 15 au  
18 Février 1977 a fait à juste titre une large place à la  
communication du Professeur HOKAMA faisant état de la mise  
au point d'un test immunologique sensible et fiable de  
détection directe de la toxine dans les tissus pisciaires  
ou d'autre nature. Les bases de cet exposé ont été publiées :  
Y. HOKAMA, A.H. BANNER and D.B. BOYLAN. A radioimmunoassay  
for the detection of ciguatoxin. Toxicon 1977 - Vol. 15.

Dans ses conclusions et perspectives le Comité  
mentionne que ce test doit constituer à brève échéance un  
outil maniable de détection des poissons vénéneux à l'échelle  
commerciale.

SPC Library  
  
35933  
Bibliothèque CPS

289

Les raisons de notre demande de déplacement à Hawaii se situaient dans ce cadre immunologique : un certain nombre de discordances apparues dans les résultats et l'interprétation de ceux-ci entre notre laboratoire et celui du Professeur HOKAMA rendaient nécessaires cette prise de contact.

## II - EXPOSE DES DONNEES A ECLAIRCIR

### II.1. Introduction

Pour renouveler ses propres expériences le Professeur HOKAMA nous a remis à trois reprises en 1976 et 1977 des antisérums anticiguatoxine de lapin et de mouton marqués à la fluorescéine. Nous avons pu grâce à son aimable collaboration effectuer une série de travaux avant la réunion du Comité, durant celle-ci et en Janvier 1978.

### II.2. Premiers essais de détection de ciguatoxine (antérieurs à la réunion du Comité).

#### II.2.1.- MATERIEL ET TECHNIQUE

- Antisérum de lapin marqué à la fluorescéine,
- Conjugué fluorescent antiimmunoglobulines humaines (Hyland),
- Coupes à congélation à 10  $\mu$  (microns) d'épaisseur de tissus pisciaires crus :
  - o muscle et foie de murènes toxiques et atoxiques
  - o muscle et foie de tilapie.
- Dinoflagellés :
  - o Diplopsalis des Gambiers dit "Gambier Wild"
  - o Diplopsalis de culture
  - o Exsuviella sp.

- La "tilapie" poisson d'eau douce est témoin négatif pour les tissus pisciaires,
- Exsuviella sp. est un dinoflagellé atoxique, témoin négatif pour Diplopsalis,
- Le conjugué anti-immunoglobulines humaines totales est utilisé pour écarter l'éventualité d'une adsorption non immunologique des protéines marquées par les antigènes,
- Les antigènes sont utilisés avec et sans fixation préalable à l'acétone,
- Le contact avec l'antisérum a été de trente minutes à 37° en chambre humide,
- L'immun sérum est employé pur ou dilué au 1/5° dans du tampon PBS ph 7,2 qui sert également au lavage contre coloration au bleu Evans,
- La réaction est réalisée en tube pour les dinoflagellés, devant l'impossibilité de faire adhérer ceux-ci à la lame.

#### II.2.2.- RESULTATS

- Absence d'adsorption non spécifique,
- Autofluorescence jaune assez marquée des foies de "tilapie", mais la lecture est possible,
- Légère luminescence verte des différents muscles sans différence significative d'avec ceux de "tilapie",
- Absence de fixation au niveau des foies. Ceux-ci sont pourtant cent fois plus toxiques que les muscles des mêmes animaux,
- Absence de fluorescence au niveau du cytoplasme ou des parois des Diplopsalis.

Devant cet insuccès, chaque manipulation a été reprise une dizaine de fois avec réalisation de microphotographies.

### II.3. Travaux effectués au cours de la réunion du Comité d'Experts.

#### II.3.1.- INTRODUCTION

L'exposé du Professeur HOKAMA a très vivement intéressé les membres du Comité. Les résultats prometteurs obtenus ouvraient des perspectives nouvelles dans la prévention de la ciguatera. Des études complémentaires de sensibilité et fiabilité du test sont décidées. L'appel à la technique radioimmunologique n'est pas un handicap pour l'équipe de MALARDE qui dispose des radio-isotopes. Une campagne de détection du poisson toxique sur le marché est envisagée dans un délai relativement bref.

Outre une revue de sa publication, le Professeur HOKAMA fait état de résultats encourageants après marquage de l'antisérum à la fluorescéine. Quelques diapositives illustrent ce travail en particulier celle montrant une fluorescence pariétale de *Diplopsalis* de souche "Gambier Wild".

#### II.3.2.- TRAVAUX EN IMMUNOFLUORESCENCE

Les mêmes antigènes que précédemment sont employés. Nous varions les temps de contact entre l'antisérum et les divers antigènes, la concentration du sérum et le pH du tampon.

Les résultats sont identiques à ceux rapportés précédemment :

- \* absence de fluorescence des parois de *diplopsalis*,
- \* absence de fluorescence significative des muscles,
- \* absence de fluorescence des foies toxiques ou non.

Ces résultats discordants amènent deux réserves du Professeur HOKAMA quant à notre protocole d'expérimentation :

- Dans sa propre technique de fluorescence il traite préalablement les dinoflagellés par le désoxycholate de soude pour dévoiler les sites antigéniques,
- Le nombre de dinoflagellés examinés dans nos manipulations est trop faible, seul un léger pourcentage de diplopsalis fixant les anticorps.

#### II.4. Etude comparative du test radioimmunologique et du test chat.

##### II.4.1.- INTRODUCTION

Conformément aux directives du Comité quatre vingt douze (92) échantillons pisciaires préalablement testés sur chats et souris sont adressés au Professeur HOKAMA.

Les résultats obtenus montrent des corrélations statistiques significatives entre le niveau de coups par minute en R.I.A. et les différents tests biologiques, puisque les coefficients calculés à Hawaii sont de :

$r = 0,394$  pour le test chat

$r = 0,564$  pour le test souris

$r = 0,545$  pour la DLM.

II.4.2.- ANALYSE CORRELATIVE MODULEE DU TEST-CHAT

L'appréciation du test-chat de manière quantitative est difficile. Aucune évaluation n'est à l'abri de critiques. Cependant pour une première appréciation visualisée sur la figure (1) nous avons porté en abcisse les différents degrés d'intoxication évalués de 1 à 6.

DEGRE DE 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

Il n'a pas été tenu compte du nombre de repas (accumulation ou non) ni du jour d'apparition des signes pathologiques. Les échantillons biologiquement atoxiques ont été absorbés à deux reprises par l'animal. Avec ces critères, le coefficient de corrélation est de 0,24 qui demeure une valeur significative. Il apparaît cependant que la pente de la droite de régression est très faible :  $15,83 +$  ou  $- 7,20$ . L'écart type est considérable, objectivant la grande variabilité.

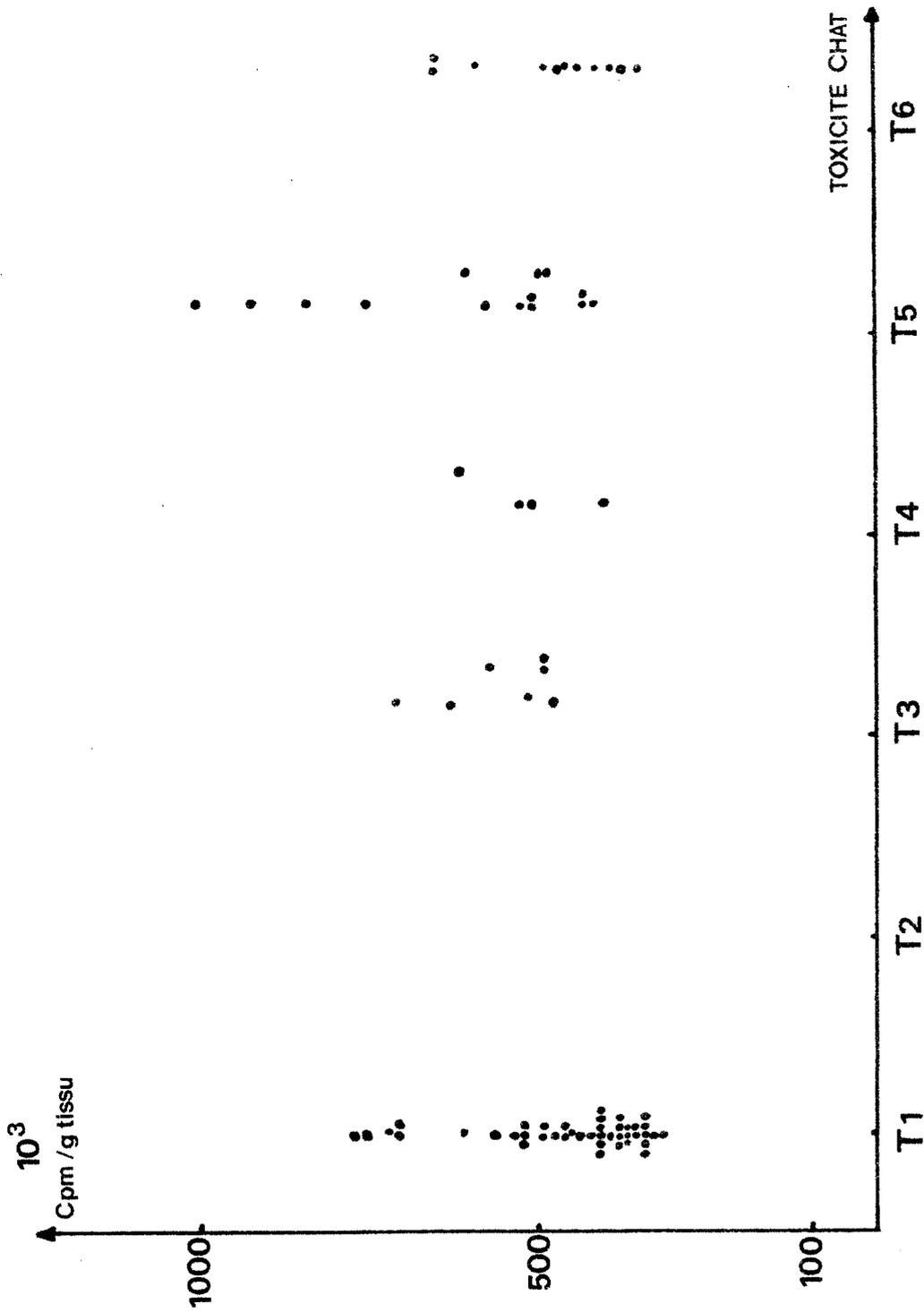


FIGURE 1

Dans la figure (2) nous tenons compte de toutes les manifestations pathologiques apparues dans les quarante huit (48) premières heures.

Ici la valeur de  $r$  est de 0,34, bon niveau de  $r$ .  
corrélacion statistique ( $r$  est supérieur à 1 %).

Dans la troisième figure nous n'avons tenu compte que des phénomènes pathologiques majeurs apparus chez le chat le premier jour (T. 5 : ataxie locomotrice et parésie des deux trains). Ces échantillons sont de façon certaine susceptibles d'entraîner l'intoxication humaine. La corrélacion statistique demeure significative.

Cependant dans l'analyse individuelle l'élimination par cette technique des chairs très toxiques sous entend l'élimination d'un minimum de 60 % du poisson sain. A l'inverse on aura la certitude de toxicité seulement dans 5 % des cas. Nous avons donc un degré d'incertitude entre 60 à 95 %.

NOTA : En tenant compte des intoxications majeures des quarante huit premières heures : T. 5 et T. 6 (mort de l'animal) la corrélacion est négative  $r$  : -0,28.

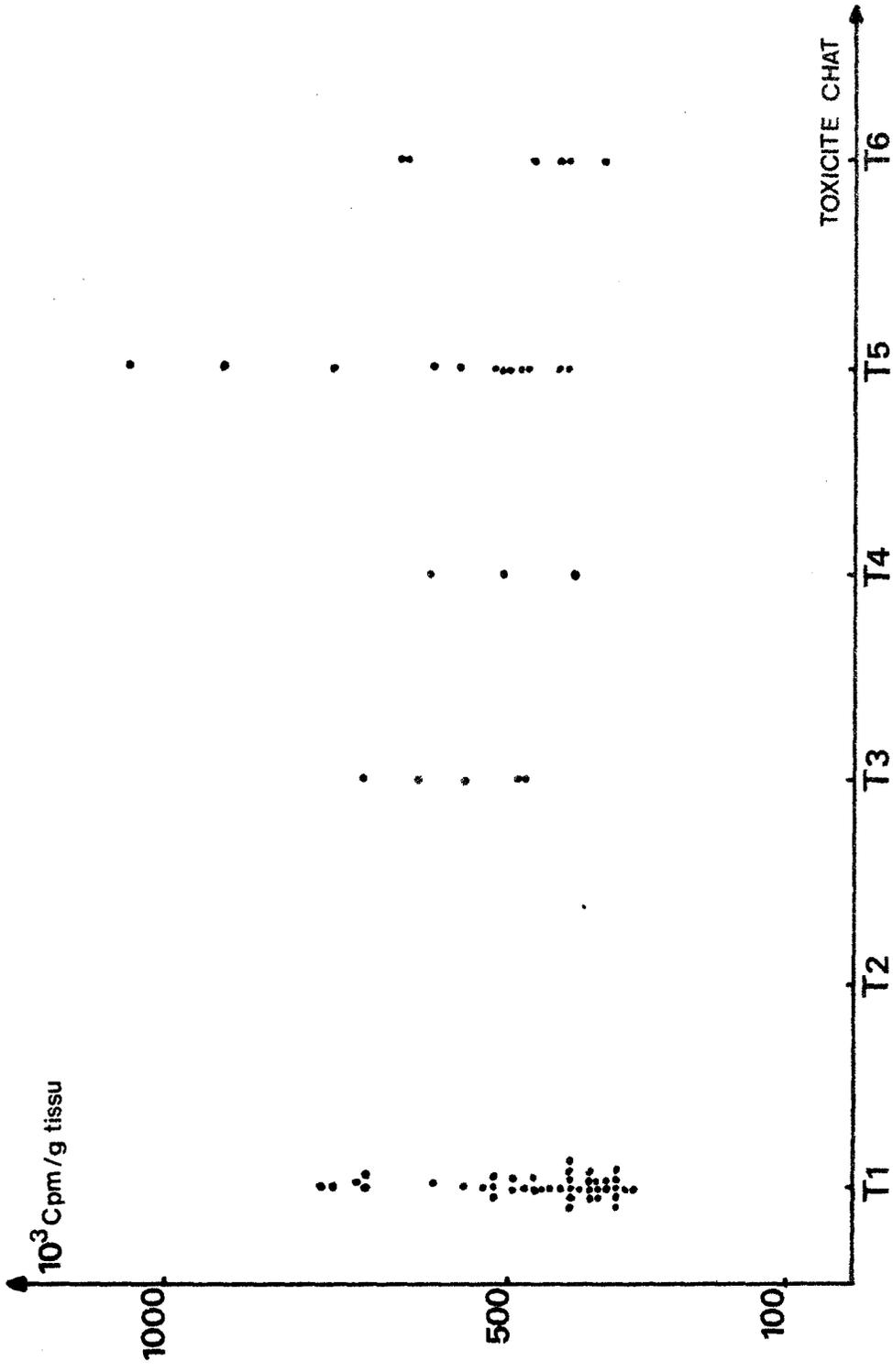


FIGURE 2

II.5 Etudes menées sur un nouvel échantillon de  
conjugué fluorescent de mouton.

II.5.1.- MATERIEL ET METHODE

- La méthodologie est superposable à celle déjà décrite mais nous disposons cette fois :
  - = de Diplopsalis des Gambiers en grande quantité et de toxicité connue (8500 Unités souris/gramme),
  - = du Dinoflagellé "PER H" strictement atoxique mais de moeurs et morphologie comparables à Diplopsalis,
  - = en plus des murènes nous utilisons également des coupes de perroquet toxique (10 Unités souris/gramme),
  - = le "poisson volant", pelagique, dépourvu de ciguatoxine est le témoin négatif.
  
- Le conjugué est dilué au demi ( $\frac{1}{2}$ ) avant et après absorption pendant quinze minutes par un broyat à l'Ultraturax de "poisson volant".

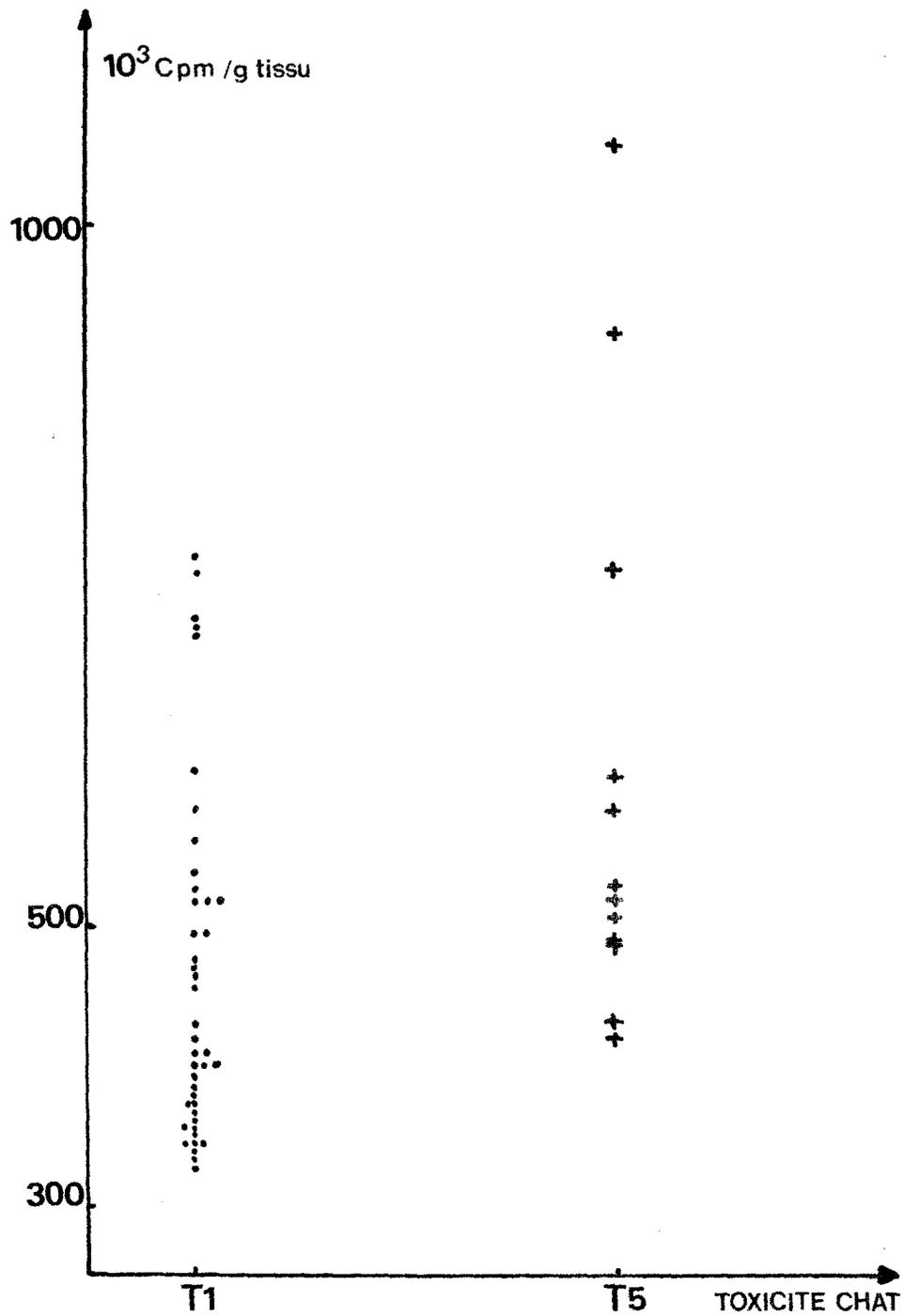


FIGURE 3

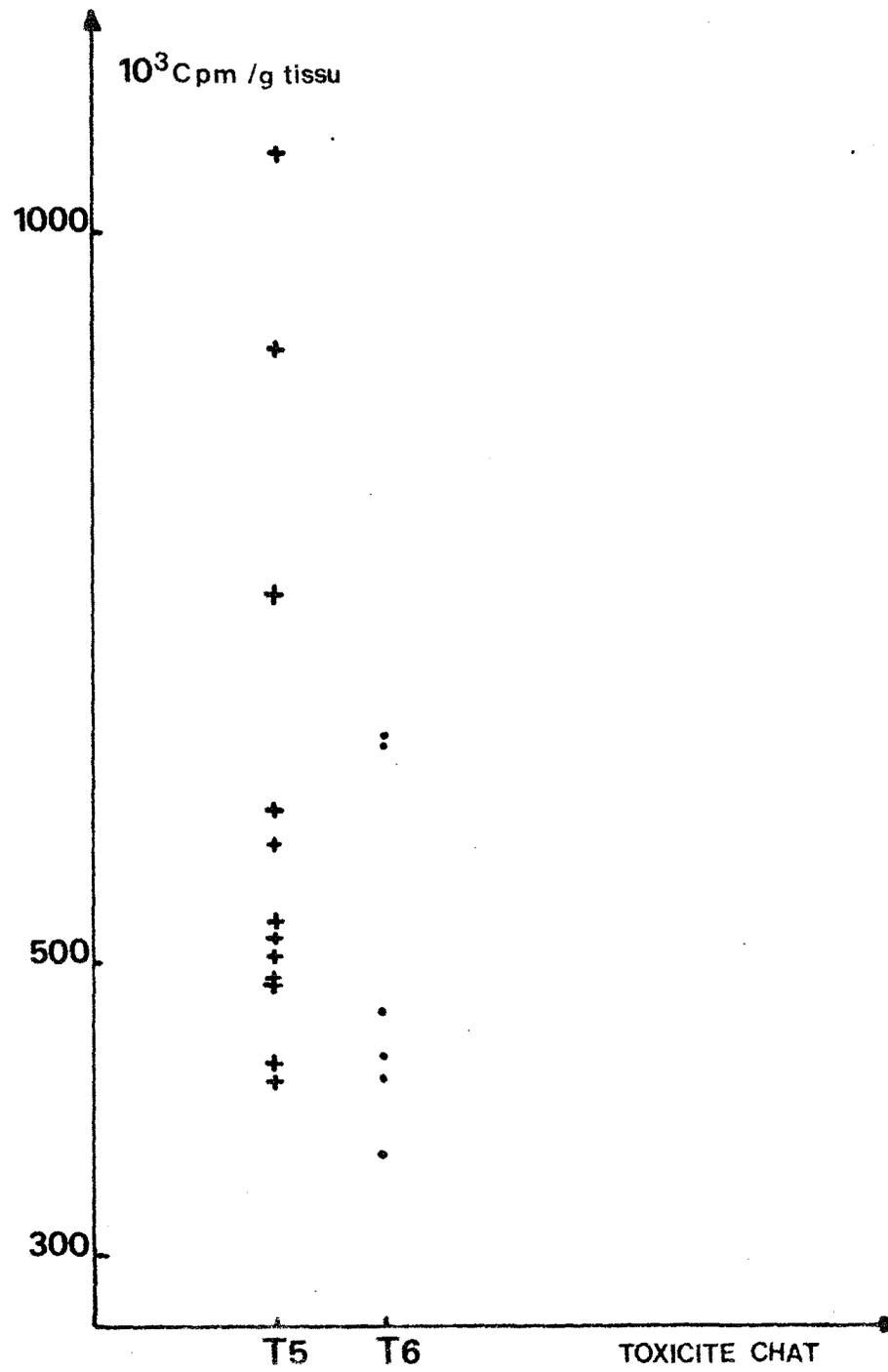


FIGURE 4



### II.5.2.- RESULTATS

a/- Dinoflagellés : aucune fluorescence n'est observée.

b/- Tissus pisciaires :

b.1- Les foies ne présentent aucune fluorescence au niveau des hépatocytes. Les parois vasculaires fixent fortement le conjugué.

b.2- Au niveau des muscles.

### SERUM BRUT

Tous les échantillons musculaires sont fluorescents. La fluorescence est plus accentuée au niveau du muscle de murène, sans intensité différentielle décelable entre toxique et atoxique.

### SERUM ABSORBE

- Disparition de la fluorescence de la chair de "poisson volant".
- Diminution importante de l'intensité de fixation au niveau des autres échantillons.

### II.6. Conclusions provisoires de ces observations

- \* Entre nos mains aucune réaction immunologique n'est visualisée au niveau de diplopsalis toxique,
- \* Cet antisérum ne se fixe pas sur les échantillons de foie très toxique d'une manière décelable en fluorescence. Ceci est étonnant car leur teneur en toxine est de deux à trois cents fois supérieure à celle du muscle du même animal,

\* Une fixation des anticorps se fait au niveau des fibres musculaires. Mais cette fixation ne varie pas de manière décelable avec la concentration en toxine (murène très toxique et atoxique).

Cette fixation se fait également de façon notable au niveau des fibres musculaires de "poisson volant".

L'intensité de fixation des anticorps varie davantage en fonction de l'espèce testée que de la toxicité de l'échantillon examiné. Il est à noter que les différences histologiques d'une espèce à l'autre sont considérables.

### III - ENTRETIENS ET EXPERIENCES AUPRES DU PROFESSEUR HOKAMA

#### III.1. Introduction

Le lundi 13 Mars, Madame CHANTEAU, biochimiste à l'Institut Malardé et moi même sommes très aimablement reçus par le Professeur HOKAMA. Nous prenons rendez-vous le même jour pour organiser le stage de perfectionnement de Madame CHANTEAU et confronter données et points de vue sur l'état actuel des études de détection immunologique de la ciguatoxine dont Monsieur HOKAMA est le promoteur. Expériences et entretiens sont parfaitement organisés et se dérouleront dans le plus parfait esprit de collaboration.

### III.2. Expériences effectuées

#### III.2.1.- MATERIEL ET METHODE

Il a été procédé à l'immunofluorescence de dinoflagellés et coupes de tissus pisciaires. Les dinoflagellés sont préalablement traités au désoxycholate de soude, les coupes fixées à l'acétone.

Des expérimentations sur les mêmes échantillons utilisant le même antisérum de mouton marqué à l'iode 125 et à la peroxydase sont entamées.

Nous laissons à Monsieur HOKAMA divers autres échantillons dont des cerveaux de chats sains et intoxiqués.

#### III.2.2.- RESULTATS

- \* Aucune fluorescence significative n'est observée au niveau des dinoflagellés,
- \* Cette même technique appliquée à des coupes de muscle toxique et atoxique a montré une fixation équivalente du conjugué fluorescent.

#### III.2.3.- ECHANGES DE VUE AVEC LE PR. HOKAMA

Nous sommes rapidement tombés d'accord sur l'impossibilité de détecter la ciguatoxine par l'immun sérum de mouton conjugué à la fluorescéine.

Le Professeur HOKAMA l'explique par un manque de sensibilité de la méthode.

Nous pensons l'un et l'autre que l'origine pisciaire de l'extrait ayant servi à l'immunisation est source de réactions non spécifiques. L'absence de fixation des anticorps sur diplo-salis peut être due à l'imperméabilité de la paroi cellulosique. Une étude après désintégration aux ultra sons serait intéressante.

L'absence de fluorescence au niveau des coupes de tissu hépatique hautement toxique est plus difficile à expliquer : selon le Professeur HOKAMA la ciguatoxine pourrait se trouver dans les hépatocytes sous forme stockée labile, lavée par l'acétone ou le tampon. A l'inverse elle serait liée de manière plus stable au niveau des fibres musculaires.

Nous sommes l'un et l'autre parfaitement d'accord sur les difficultés qui restent à surmonter pour rendre cette méthode de détection applicable sur le terrain.

Le marquage radio-isotopique augmente la sensibilité, mais malgré les corrélations statistiques laissant supposer la présence d'anticorps spécifiques la grande variabilité des résultats en fonction de l'espèce reste à surmonter.

Une approche de ce problème pourrait être l'absorption de l'antisérum par un poisson de même espèce, ajoutée à une standardisation du tissu à prélever, pour pallier aux variations de structure. L'absorption des anticorps anti muscle (antigène lipidique hapténique extrait de muscle de murène) diminuerait très vraisemblablement le bruit de fond, actuellement trop élevé.

Une autre méthode envisageable serait la purification du sérum par immuno-adsorbant.

Un test valable évalué en radioimmunologie devra être adapté à l'immunoenzymologie, les avantages de cette dernière méthode étant évidents.

#### IV - CONCLUSION

Les difficultés de mise au point d'un test immunologique fiable et sensible de détection directe de la toxine ne sont pas surmontées. Un tel test devra satisfaire à deux impératifs :

- : éliminer à coup sûr les échantillons très toxiques
- : ne pas éliminer plus de 10 % de poisson consommable.

Ces 10 % constituent à notre avis et à celui du Professeur HOKAMA le seuil tolérable, surtout en Polynésie où le poisson est une base essentielle de l'alimentation.

Les efforts des chercheurs doivent se porter sur la purification des immuns sérums existants et surtout la reprise de l'immunisation d'animaux par des toxines purifiées ou non ne provenant pas de poissons mais de *Diplopsalis* pour éviter au maximum les réactions non spécifiques.

Ces problèmes techniques n'hypothèquent en rien l'intérêt de la poursuite des recherches immunologiques.

Toutefois avant de passer au stade pratique initialement prévu, nous estimons indispensable un bilan général des divers résultats lors de la prochaine réunion du Comité d'Experts.

A notre avis la priorité devra être donnée à la production d'immun-sérums de meilleure qualité : option déjà prise par l'Institut Malardé où des lapins sont en cours d'immunisation par des extraits purifiés de ciguatoxine extraite de *Diplopsalis* sauvages des Gambiers.