

La recherche sur la ciguatera en Polynésie française

par le Dr Anne-Marie Legrand,
Institut Louis Malardé,
Tahiti (Polynésie française)

La section Océanographie médicale de l'Institut de recherches médicales Louis Malarmé travaille actuellement à divers aspects de la recherche sur la ciguatera, notamment :

- la surveillance, l'isolement et la culture du dinoflagellé *Gambierdiscus toxicus*;
- l'isolement des toxines à partir de poissons et de dinoflagellés aux fins de caractérisation chimique;
- la détection des toxines par biodosage, fluorescence des dérivés toxiques et le dosage par fixation membranaire;
- l'immunochimie des toxines et la production des anticorps nécessaires à l'immunodétection; et
- l'épidémiologie de cas avérés.

Le groupe de recherches en laboratoire que je dirige se compose de Mireille Chinain et de Serge Pauillac. Philippe Glaziou est chargé de l'enquête épidémiologique. Un étudiant est en train de terminer un programme de recherche pour la rédaction d'une thèse de doctorat sur *G. toxicus*. Bon nombre des progrès qui ont été enregistrés dans ce domaine sont le fait d'une collaboration fructueuse entre le groupe de Tahiti et celui de Yasumoto, au Japon.

De 1986 à 1990 — Isolement des toxines ciguateriques et caractérisation chimique

Les chercheurs ont démontré la diversité des ciguatoxines que l'on trouve dans les poissons et ont identifié des toxines mineures moins polarisées à partir de poissons carnivores. Ils ont réussi, en recueillant des échantillons de ciguatoxine pure (CTX), isolée à partir de foies de murènes prélevés aux Tuamotu et aux Marquises, à élucider la structure du principal composé toxique, la ciguatoxine (codée CTX-1B), qui a été isolée pour la première fois par le groupe de Scheuer qui lui a donné son nom. Par la suite, on a découvert que la CTX-1B était la principale toxine présente dans les murènes, ainsi que dans des vivaneaux tels que *Lutjanus bohar* et des loches telles que *Plectropomus leopardus*.

Nous supposons qu'il s'agit du principal composé chimique présent dans la majorité des poissons carnivores ciguatoxiques. Le travail d'isolement, qui s'est fait par un examen minutieux de toutes les fractions toxiques, a abouti à la caractérisation chromatographique de plusieurs ciguatoxines dont la polarité est différente lorsqu'on les soumet à la chromatographie à polarité de phase inversée. Ces toxines ont également un poids moléculaire différent de la CTX-1B. La structure de certaines de ces toxines a récemment été élucidée.

Il est intéressant de constater que l'on n'a trouvé que des ciguatoxines moins polarisées, et aucune trace de CTX dans les poissons herbivores. On a également essayé d'isoler des toxines de la chair de perroquets provenant des Iles Gambier et Tuamotu. L'analyse du spectre de masse d'une toxine présentant une durée de rétention très proche de celle de la CTX sur colonne à polarité inversée a permis de la caractériser comme étant différente de la CTX. On a établi que ses principaux composés étaient des fractions toxiques moins polarisées. Au cours des dernières années, des tentatives visant à recueillir des toxines à partir de viscères ont échoué. Ces tissus se sont révélés être non toxiques, contrairement à ce que l'on a constaté dans les poissons carnivores.

La production de ciguatoxines par *G. toxicus*, probables précurseurs des toxines présentes dans les poissons

Production de ciguatoxines à l'état naturel

Le travail d'isolement effectué sur extrait liposoluble d'un grand nombre de *G. toxicus* à l'état naturel (environ 20 000 millions de cellules) a abouti à la caractérisation par chromatographie de neuf composés toxiques de masses moléculaires différentes. Deux d'entre eux, identifiés comme étant des stéréoisomères, ont été codés CTX-4A et CTX-4B ou toxines GT. L'analyse de la structure de CTX-4B a révélé qu'elle possède les 13 cycles d'éther de CTX-1B.

Au cours des quatre dernières années, on a observé à plusieurs reprises des flambées sporadiques de *G. toxicus* à Tahiti. Après collecte des dinoflagellés et extraction d'échantillons, on a constaté qu'il présentait chez la souris une ciguatoxicité proche de celle qui a été observée pour CTX-4B.

Production de ciguatoxines en culture

On a réussi à déterminer la structure d'un précurseur de la ciguatoxine isolé à partir de *G. toxicus* à l'état naturel, ce qui renforce nos espoirs d'obtenir des ciguatoxines et/ou des analogues d'autres sources que les poissons. A cette fin, nous avons entrepris un programme de culture massive il y a deux ans. Contrairement au travail de culture précédent, qui portait principalement sur une souche de *G. toxicus* des Iles Gambier, dont l'extrait liposoluble présentait à peine quelques traces de toxine, le nouveau programme comprend le dépistage de seize souches clonales en culture massive. Quatre de ces souches ont produit des ciguatoxines et toutes ont produit de la maitotoxine.

Méthodes de détection de la ciguatoxine dans le poisson

Biodosage

Les biodosages servent toujours à choisir individuellement des poissons toxiques avant l'extraction chimique (biodosages sur moustiques) ou à localiser des fractions toxiques pendant la purification par chromatographie (biodosages sur souris). La méthode d'extraction rapide sur 4g de chair de poisson et l'injection intrathoracique de trois dilutions de l'extrait de poisson à des lots de dix moustiques ont permis d'établir par calcul le DL_{50} et de classer les poissons en quatre groupes: non toxiques, cas limites, modérément toxiques et hautement toxiques.

Seuls les poissons appartenant au groupe non toxique peuvent être consommés sans danger, tandis que seuls ceux appartenant au groupe hautement toxique sont utilisés pour isoler des ciguatoxines. Sur la courbe standard dose/temps de survie, le temps de survie permet d'évaluer la toxicité totale des fractions toxiques, dont des parties aliquotes ont été injectées par voie intrapéritonéale à trois souris.

Détection par fluorométrie des dérivés de toxines au moyen de la chromatographie en phase liquide à haute performance

La présence d'un groupe hydroxyle primaire sur la chaîne latérale de la CTX (codée IB) laissait entrevoir que la toxine pouvait être dérivée en ester fluorescent au moyen de l'anthrolylnitrile. Des traces de la toxine ont été décelées par chromatographie en phase liquide à haute performance fluorométrique. Le niveau de détection minimal pour la CTX pure est d'environ 0,3 ng.

Récemment, neuf composés moins polarisés provenant de poissons carnivores ont été dépistés aux fins de dérivation et de détection par la méthode HPLC. Cinq de ces toxines ont été identifiées au moyen de la méthode HPLC fluorométrique, et sont donc réputées posséder un groupe hydroxyle primaire sur une chaîne latérale; quatre autres toxines n'ont pas pu être décelées et sont donc réputées ne pas posséder ce groupe hydroxyle primaire. A partir de ces données, nous avons pu évaluer que dans environ 95% des cas, la toxicité des poissons carnivores peut être établie au moyen de la fluorométrie.

De la CTX partiellement purifiée ($DL_{50} = 0,3\text{mg/kg}$) a été dérivée et décelée à un niveau de sensibilité raisonnable grâce à cette méthode. Il faudra faire d'autres expériences sur le traitement préalable de l'extrait de poisson avant la dérivation. Cependant, les résultats que nous obtenons actuellement indiquent qu'une méthode de détection pratique par HPLC des ciguatoxines sera disponible dans un proche avenir.

Dosage par fixation membranaire

Récemment, on a effectué des tests immuno-chimiques sur des synaptosomes de cerveaux de rats. La CTX-1B et la CTX-4B (isolées à partir de *G. toxicus* en liberté) ont avantageusement empêché la fixation de la brévétotoxine [^3H] PbTx-3, dont on sait qu'elle interagit avec le site 5 de la protéine du canal sodique. Dans les conditions expérimentales que nous avons mises au point, l'affinité de la CTX-1B était trente fois plus élevée que celle de la PbTx-3, alors que celle de la CTX-4B était pour ainsi dire identique à celle de la brévétotoxine. Des expériences portant sur des toxines mineures moins polarisées, isolées à partir de tissus ciguatoxiques sont en cours. Les résultats préliminaires indiquent que les composés ont en commun la propriété d'inhiber la fixation de [^3H] PbTx-3.

Cette propriété est actuellement mise à profit pour évaluer la ciguatoxicité de poissons dangereux. Une méthode d'extraction rapide et un dosage par fixation ordinaire ont été mis au point. La méthode a été utilisée pour vérifier quelques extraits de chair de murène. On a pu détecter des murènes, toxiques à la limite, qui provoquent une faible toxicité dans les souris. Les résultats de ces travaux préliminaires, s'ils peuvent s'appliquer à diverses espèces de poisson, montrent que le dépistage de poissons dangereux au moyen de la fixation à haute affinité de ciguatoxines aux canaux sodiques voltage-dépendant, est réalisable.

Immunodétection de la ciguatoxine

La mise au point d'un test immuno-chimique sensible et spécifique pour la détection de poissons ciguatoxiques demeure un grand défi. Bien qu'une trousse de dépistage, qui doit être commercialisée, soit en cours de conception et de mise au point, nous avons lancé notre propre projet d'immunodétection il y a quelques années à l'Institut Pasteur, à Paris. La présence d'un groupe hydroxyle terminal dans la molécule de CTX laisse supposer qu'on pourrait l'utiliser sélectivement pour préparer un composé ciguatoxine-protéine pouvant être injecté aux animaux pour les immuniser.

Etant donné qu'il s'agit de micro-quantités de toxine purifiée, il faut mettre au point des techniques de miniaturisation. Une première expérience a été réalisée au moyen de monensin, un polyéther de faible masse moléculaire. On a réussi à produire des anticorps spécifiques au monensin dans les lapins et les souris. D'importantes quantités de monensin ont été converties en hémisuccinate et fixées par liaison covalente à de l'albumine bovine au moyen de la méthode anhydre mixte.

Les deux antisérums ont été utilisés dans le cadre d'un dosage micro-enzymétrique sur plaques Terasaki et ont réagi fortement avec les composés monensin-protéine lors d'un test indirect et dans une moindre mesure avec du monensin libre lors d'un dosage par compétition. Aucune réactivité hétérospécifique contre la CTX n'a été décelée, mais l'élaboration d'un

test immuno-chimique miniaturisé pour le monensin, fondé sur un réactif monoclonal, a constitué la base de l'élaboration de tests immunologiques semblables pour les haptènes polyéthers.

Une méthode exigeant à peine 100 µg d'haptène est à l'étude avec de la brévotoxine PbTx-3 et de la CTX. Les résultats d'expériences récentes sont très prometteurs et des produits d'immunisation sont en cours d'échantillonnage.

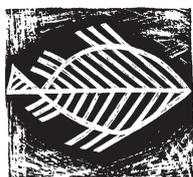
Bibliographie

- Legrand, A.-M., M. Litaudon, J.-N. Genthon, R. Bagnis et T. Yasumoto. 1989. *Isolation and some properties of ciguatoxin*. J. Appl. Phycol. 1, 183-188.
- Legrand, A.-M., M. Fukui, P. Cruchet, Y. Ishibashi et T. Yasumoto. 1992. *Characterization of ciguatoxins from different fish species and wild G. toxicus*. Dans : Actes de la troisième Conférence internationale sur la ciguatera, Porto-Rico, T. R. Tosteson (éd.), Polyscience Publications, Québec, Canada, pp. 25-32.
- Murara, M., A.-M. Legrand, Y. Ishibashi et T. Yasumoto. 1989. *Structure of ciguatoxin and its congener*. J. Am. Chem. Soc., 111, 8929-8931.
- Pauillac, S., T. Malmos, H. Labrousse, K. Antonakis et S. Avrameas. 1993. *Production of highly specific monoclonal antibodies and development of a micro-elisa test for monensin*. J. Immunol. Methods (sous presse).

Structures et origine des toxines ciguatériques

par Takeshi Yasumoto
Faculté d'agronomie
Université Tohoku, Sendai (Japon)

Les biochimistes qui se sont attachés à élucider la structure des toxines ciguatériques se sont heurtés à une tâche difficile, certes, mais combien passionnante. Pour commencer, il était difficile d'obtenir d'importantes quantités de poisson toxique pour en extraire les toxines. La concentration extrêmement basse des toxines dans le poisson rendait le processus de purification laborieux et fastidieux. Des tonnes de poissons ne produisaient qu'une quantité



minuscule de toxine pure dont la complexité moléculaire ne faisait qu'accroître la difficulté.

En dépit de ces difficultés, et grâce à l'évolution rapide des techniques de spectroscopie ainsi qu'à la collaboration de nombreux amis, nous avons pu élucider la structure de plusieurs toxines importantes, et nous sommes tout à fait convaincus que celle de la majorité des toxines ciguatériques le sera très bientôt. Sur quoi nous pencherons-nous ensuite? Les chimistes ne sont pas au bout de leurs peines: élaboration de méthodes d'analyse, préparation d'antigènes et synthèse des toxines, tandis que plusieurs autres aspects intéresseront les biologistes.