

ANNEE 2004

N°72

THESE

pour le

DIPLÔME D'ETAT

DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Par

Ronan LE BOT

Présentée et soutenue publiquement le 14 décembre 2004

**DETECTION COLORIMETRIQUE DES TOXINES
DIARRHEIQUES PAR INHIBITION DES PROTEINES
PHOSPHATASES PREPAREES
EXTEMPORANEMENT**

Président : Monsieur Yves François POUCHUS, Professeur de Cryptogamie et Botanique.

Membre du jury : Monsieur Olivier GROVEL, Maître de conférences en Pharmacognosie.

Madame Anne-Carole DOSSMANN, Pharmacien d'officine à Nantes.

A Monsieur Yves-François POUCHUS, Professeur de Cryptogamie
et Botanique,

Qui m'a fait l'honneur de présider ce jury.

Veillez accepter le témoignage de tout mon respect et mes sincères
remerciements.

A Monsieur Olivier GROVEL, Maître de conférences en
Pharmacognosie,

Qui m'a fait l'honneur de diriger cette thèse.

Veillez accepter le témoignage de toute ma gratitude ainsi que mes
plus sincères remerciements pour votre aide, votre disponibilité et
vos encouragements.

A Madame Anne-Carole DOSSMANN, Pharmacien d'officine à
Nantes,

Qui m'a fait l'honneur de participer à ce jury, et qui m'a soutenue
depuis le début,

Veillez accepter le témoignage de toute ma reconnaissance.

A mes parents,

A Lucie, pour son aide précieuse,

A toute ma famille,

A ma future belle-famille,

A mes amis, pour tous les souvenirs.

Sommaire

INTRODUCTION	15
LES TOXINES DIARRHEIQUES ET LEUR DETECTION :.....	17
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	17
PREMIERE PARTIE :	18
LE PHYTOPLANCTON ET LES EFFLORESCENCES	18
1. Le phytoplancton	19
1.1. Définition.....	19
1.1.1. Les diatomées	19
1.1.2. Les dinoflagellés : Dinophycées.....	22
2. Les efflorescences algales	25
2.1. Les phénomènes d'eaux colorées	26
2.1.1. Les organismes responsables.....	28
2.1.2. Les facteurs de déclenchement.....	30
La température	30
La salinité.....	31
Les sels nutritifs	31
Le pH.....	32
Divers	32
2.1.3. Fin du phénomène	33
2.2. Les efflorescences à caractère toxique	34
2.2.1. Les efflorescences nuisibles par des algues non toxinogènes	34
2.2.2. Les efflorescences productrices de toxines.....	35

DEUXIEME PARTIE :	37
LES INTOXICATIONS A TOXINES DIARRHEIQUES.....	37
1. Introduction	38
2. Toxines responsables : L'acide okadaïque et ses dérivés.....	39
2.1. L'acide okadaïque.....	39
2.1.1. Historique	39
2.1.2. Répartition	40
2.1.3. Structure et propriétés physico-chimiques de l'acide okadaïque	45
2.1.4. Propriétés biochimiques.....	48
2.1.4.1. Mécanismes d'action	48
2.1.4.2. Effet diarrhéique de l'acide okadaïque	50
2.1.4.3. Activité promotrice tumorale.....	51
2.1.5. Signes cliniques d'une intoxication diarrhéique causée par l'acide okadaïque	52
2.2. Toxines associées.....	53
2.2.1. Les pecténotoxines (PTXs).....	53
2.2.2. Les yessotoxines (YTXs).....	56
2.2.3. Les azaspiracides (AZAs).....	58
3. La réglementation.....	61
4. La situation en France.....	63
Les efflorescences algales et le réseau de surveillance en France.....	63
TROISIEME PARTIE :	66
LES METHODES DE DETECTION DES TOXINES DIARRHEIQUES DANS LES COQUILLAGES	66
1. Les méthodes reposant sur la toxicité de l'acide okadaïque.....	67

1.1. Bioessais sur animaux.....	67
1.1.1. Sur rongeurs.....	67
Critère de positivité : Action létale	67
Critère de positivité : Action diarrhéique.....	68
1.1.2. Sur invertébrés	69
1.2. Cultures cellulaires	70
1.2.1. Modifications morphologiques.....	70
1.2.2. Viabilité	71
2. Les méthodes physico-chimiques	72
2.1. Méthodes chromatographiques.....	72
2.2. Electrophorèse capillaire	74
3. Les méthodes immunologiques.....	74
4. Les méthodes biochimiques	75
DEVELOPPEMENT D'UN TEST DE DETECTION DES TOXINES :.....	77
PARTIE EXPERIMENTALE.....	77
1. Introduction	78
2. Utilisations des cellules KB comme source enzymatique	80
2.1. Les cellules KB.....	80
2.1.1. Origine	80
2.1.2. Entretien des cellules	80
2.1.3. Obtention du lysat.....	81
2.2. Le Para Nitro Phényl Phosphate (PNPP).....	82
2.3. Les différentes dilutions de l'acide okadaïque	83
2.4. Résultats et discussions	84
2.4.1. Mise en évidence de l'activité enzymatique	84

2.4.2. Mise en évidence de l'inhibition enzymatique par diminution de la coloration	85
2.4.2.1. Objectif	85
2.4.2.2. Protocoles	85
2.4.2.3. Résultats	86
2.4.3. Détermination du temps optimal d'incubation.	88
2.4.3.1. Protocoles	88
2.4.3.2. Résultats	88
2.4.4. Détermination du volume optimal de substrat	91
2.4.4.1. Protocoles	91
2.4.4.2. Résultats	92
2.4.5. Détermination de la sensibilité	95
2.4.5.1. Objectif	95
2.4.5.2. Protocoles	95
2.4.5.3. Résultats	95
2.4.6 Conclusion	96

3. Recherche de nouvelles sources de protéines phosphatases 97

3.1. Introduction	97
3.2. Matériels et méthodes	97
3.2.1. Utilisation de cellules musculaires de vertébrés : filet de volailles.	97
3.2.1.1. Protocoles	97
3.2.1.2. Résultats	98
3.2.1.3. Conclusion	98
3.2.2. Utilisation de la chair de poisson	99
3.2.2.1. Protocoles	99
3.2.2.2. Résultats	99
3.2.2.3. Conclusion	99
3.2.3. Utilisation d'invertébrés marins	100
3.2.3.1. Test de coloration simple	100
3.2.3.1.1. Protocoles	100
3.2.3.1.2. Résultats	100
3.2.3.1.3. Conclusion	101

3.2.3.2. Test de diminution de l'absorbance	102
3.2.3.2.1. Protocoles.....	102
3.2.3.2.2. Résultats.....	102
3.2.4. Comparaison des résultats obtenus entre le lysat de cellules KB et le lysat d'invertébrés marins	105
3.2.4.1. Protocoles.....	105
3.2.4.2. Résultats.....	106
CONCLUSION	108
BIBLIOGRAPHIE	110

Liste des abréviations

ADAM :	9-Anthryl-diazo-méthane
AFSSA :	Agence Française de Sécurité Sanitaire
AO :	Acide okadaïque
ASP :	Amnesic Shellfish Poisoning
ATX:	Adriatoxine
AZA :	Azaspiracide
BME :	Basal Medium Eagle
CE :	Concentration efficace
CHL :	Chinese hamster lung
DDASS :	Direction départementale des affaires sanitaires et sociales
DL50:	Dose létale 50
DRAME :	Détection Rapide de l'Acide Okadaïque dans les moules Après Extraction
DSP :	Diarrheic Shellfish Poisoning
DTX :	Dinophysistoxine
e.s.m. :	standard error (of estimate mean value)
IAFM :	Intoxication amnésiante par les fruits de mer
IDFM :	Intoxication Diarrhéique par Fruits de Mer
IFREMER :	Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer
IPFM :	Intoxication paralysante par les fruits de mer
LDH :	Lactate déshydrogénase
LNR :	Laboratoire National de Référence
PBS :	Phosphate Buffered Saline
PNP:	ParaNitroPhénol
PNPP:	Para NitroPhényl Phosphate
PP :	Protéines Phosphatase
PSP :	Paralytic Shellfish Poisoning
PTX :	Pectenotoxine
REPHY :	Réseau de surveillance de phytoplancton et de phycotoxine
US :	Unité souris
YTX :	Yessotoxine

Liste des figures

Figure 1 : Principaux genre de diatomées.....	21
Figure 2 : Principaux genres de dinoflagellés.....	24
Figure 3 : Schéma général des causes hypothétiques des efflorescences algales.....	27
Figure 4 : Fréquences des principaux groupes phytoplanctoniques dans les efflorescences algales	29
Figure 5 : <i>Dinophysis acuminata</i> (M.E.B.).....	42
Figure 6 : Présence de toxine DSP en Europe (Période 1993-2002).....	43
Figure 7 : Présence de toxine DSP en Amérique du nord (Période 1993-2002).....	44
Figure 8 : Structure de l'acide okadaïque	47
Figure 9 : Mécanisme d'action de l'acide okadaïque et ses dérivés au niveau moléculaire : inhibition des protéines phosphatases.....	49
Figure 10 : Structure des pecténotoxines.....	54
Figure 11 : Structure de la yessotoxine.	57
Figure 12 : Structure des azaspiracides.	60
Figure 13 : Points de prélèvements en France.....	65

Liste des tableaux

Tableau 1 : Position taxonomique des quelques genres de diatomées.	20
Tableau 2 : Position taxonomique des genres de dinophycées.....	23
Tableau 3 : Absorbances moyennes à 405 nm (\pm e.s.m.) après addition d'acide okadaïque sur du lysat de cellules KB.....	86
Tableau 4 : Absorbance moyenne en fonction du temps et de la concentration en acide okadaïque (\pm e.s.m.)	89
Tableau 5 : Absorbances moyennes à 405 nm (\pm e.s.m.) après addition de différents volume de PNPP sur du lysat de cellules KB.....	92
Tableau 6 : Absorbances moyennes à 405 nm (\pm e.s.m.) après addition d'acide okadaïque sur du lysat d'invertébrés marins	102
Tableau 7 : Absorbances moyennes à 405 nm après addition d'acide okadaïque sur du lysat d'invertébrés marins et sur du lysat de cellules KB.....	106

Liste des graphes

Graphe 1 : Inhibition de l'activité phosphatase du lysat de cellules KB sur le PNPP : .	87
Graphe 2 : Coefficient de corrélation	90
Graphe 3 : Inhibition de l'activité phosphatase du lysat de cellules KB sur le PNPP :	93
Graphe 4 : Inhibition de l'activité phosphatase du lysat de cellules KB sur le PNPP : .	94
Graphe 5 : Inhibition de l'activité phosphatase du lysat d'invertébrés marins sur le PNPP :.....	103
Graphe 6 : Inhibition de l'activité phosphatase du lysat d'invertébrés marins sur le PNPP et du lysat de cellules KB	106

INTRODUCTION

Depuis plusieurs dizaines d'années, des phénomènes d'efflorescences d'algues unicellulaires toxiques se développent sur le littoral de nombreux pays (France, Japon, Espagne, Norvège...). C'est un phénomène qui se produit spontanément à la suite de conditions climatiques particulières.

En France, un dinoflagellé du genre *Dinophysis* produit une toxine, l'acide okadaïque, qui s'accumule dans les bivalves filtreurs (les moules par exemple). La consommation de ces coquillages provoque des intoxications de type gastro-entérites. Ce phénomène se renouvelle chaque fois que la densité de l'organisme responsable atteint un seuil limite.

Un tel évènement a des conséquences importantes tant sur le plan sanitaire (l'acide okadaïque, outre le fait qu'il provoque une gastro-entérite, a des propriétés de promoteur tumoral), que sur les importantes répercussions économiques liées à l'interdiction de la vente des produits contaminés, entraînant un manque à gagner pour toute la filière surtout en été.

Pour détecter les toxines responsables, les laboratoires d'IFREMER chargés de la surveillance des lieux de production disposent actuellement d'un "test souris" qui consiste à évaluer la toxicité aiguë des coquillages potentiellement contaminés, principalement des moules (injection d'extraits d'hépatopancreas) sur des souris vivantes.

En dépit de ce test en particulier et de tous les autres, il est à noter qu'aucun à l'heure actuelle n'a pu être validé de façon officielle. En conséquence, la mise au point d'une méthode alternative, à l'utilisation d'animaux, de détection rapide, simple et fiable de l'acide okadaïque est indispensable.

Les travaux exposés dans cette thèse correspondent à cet objectif. Dans un premier temps, nous commencerons par détailler le phytoplancton et les efflorescences, puis nous aborderons les intoxications diarrhéiques.

Dans la troisième partie nous étudierons les méthodes de détection de l'acide okadaïque et enfin nous développerons le test de caractérisation mis en place.

**LES TOXINES DIARRHEIQUES ET LEUR
DETECTION :
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.**

PREMIERE PARTIE :

LE PHYTOPLANCTON ET LES EFFLORESCENCES

1. Le phytoplancton

1.1. Définition

Le phytoplancton est constitué par l'ensemble des organismes végétaux qui sont en suspension dans les eaux. Les espèces phytoplanctoniques sont en général unicellulaires, et le plus souvent autotrophes, c'est-à-dire qu'elles peuvent synthétiser leur propre substance organique à partir d'éléments minéraux, par le mécanisme de la photosynthèse. En servant de nourriture aux organismes animaux qui ne peuvent effectuer cette synthèse, le phytoplancton est un élément fondamental de la chaîne alimentaire. Le nombre d'espèces différentes à l'échelle mondiale est évalué entre 3400 à 4000 (Sournia *et al.*, 1990).

1.1.1. Les diatomées

Les diatomées sont des algues unicellulaires de forme généralement variables, enveloppées de deux thèques de nature pectique imprégnées de silice. Elles vivent soit à l'état d'individus isolés soit en colonies (Figure 1). Leur cytoplasme contient des chromoplastes colorés en jaune, vert ou brun, qui renferment les principaux pigments photosynthétiques : chlorophylles, xanthophylles ainsi qu'un pigment accessoire brun : la diatomine (Ehrhardt & Seguin, 1978).

En début d'été, lorsque le milieu est riche en éléments minéraux, elles prolifèrent massivement à la surface de la mer. Certaines d'entre elles s'accumulent dans le fond à des profondeurs voisines de 4000 mètres.

Le tableau 1 rappelle la position taxonomique des principaux genres de diatomées.

Tableau 1 : Position taxonomique des quelques genres de diatomées
(d'après Ehrhardt, 1978).

Classe des DIATOMOPHYCEES	
Sous-classe des CENTROPHYCIDEES (Diatomées centriques)	Sous-classe des PENNATOPHYCIDEES (Diatomées pennées)
<p>Ordre des COSCINODISCALES</p> <p>Genres :</p> <p><i>Skeletonema</i></p> <p><i>Thalassiosira</i></p>	<p>Ordre des DIATOMALES</p> <p>Genres :</p> <p><i>Asterionella</i></p> <p><i>Thalassionema</i></p>
<p>Ordre des BIDDULPHIALES</p> <p>Genres :</p> <p><i>Chaetoceros</i></p> <p><i>Biddulphia</i></p>	<p>Ordre des NAVICULALES</p> <p>Genres :</p> <p><i>Navicula</i></p> <p><i>Nitzschia</i></p> <p><i>Pleurosigma</i></p> <p><i>Pseudonitzschia</i></p>
<p>Ordre des RHIZOLENIALES</p> <p>Genre : <i>Rhizosolenia</i></p>	

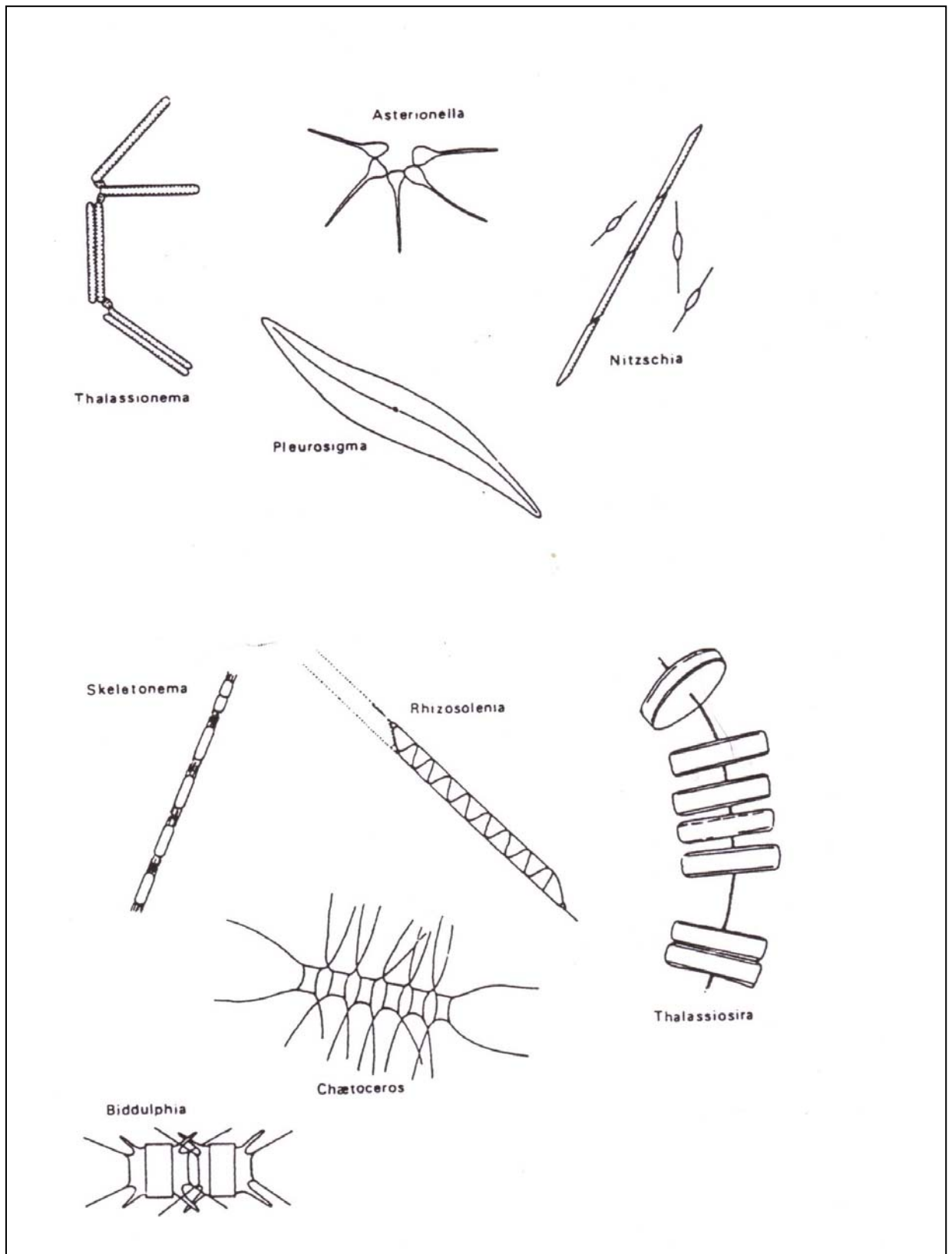


Figure 1 : Principaux genre de diatomées (d'après Ehrhardt, 1978).

1.1.2. Les dinoflagellés : Dinophycées

Les dinoflagellés (ou Dinophycées) sont des algues unicellulaires possédant deux flagelles orientés perpendiculairement l'un par rapport à l'autre. Nous distinguons les dinoflagellés "nus" comme les Noctiluques (*Noctiluca miliaris*) qui présentent une enveloppe de nature cellulosique, des autres qui sont dotés d'une thèque ou d'une cuirasse faite de plaques distinctes soudées entre elles.

La figure 2 rappelle la position taxonomique de quelques genres de dinophycées (Sournia, 1986).

Ce sont des organismes unicellulaires de 40 à 60 μm présentant un noyau volumineux particulier aux dinophycées : "le dinocaryon".

Leur cytoplasme contient des chromoplastes jaune verdâtre de structure lamellaire. Il contient en plus des chlorophylles et des xanthophylles, de la péricidine (pigment surajouté à la chlorophylle chez les péricidiniens), de la dinoxanthine (pigment propre aux dinoflagellés) et des caroténoïdes.

Tableau 2 : Position taxonomique des genres de dinophycées (d'après Sournia, 1986).

<p style="text-align: center;">Classe des DINOPHYCEES</p> <p style="text-align: center;">Ordre des DINOPHYSALES Genre : <i>Dinophysis</i> (Ehrenberg 1839)</p> <p style="text-align: center;">Ordre des PROROCENTRALES Genre : <i>Prorocentrum</i> (Ehrenberg 1834)</p> <p style="text-align: center;">Ordre des GYMNODINIALES Genres : <i>Gymnodinium</i> (Stein 1878) <i>Gyrodinium</i> (Kofoid, Swezy 1921) <i>Ptychodiscus</i> (Stein 1883)</p> <p style="text-align: center;">Ordre des PERIDINALES Genres : <i>Alexandrium</i> (Halim 1960) <i>Gamberdiscus</i> (Adachi 1979) <i>Gonyaulax</i> (Diesing 1966) <i>Peridinium</i> (Ehrenberg 1832) <i>Proto-peridinium</i> (Bergh 1881) <i>Ceratium</i> (Schrank 1793)</p>

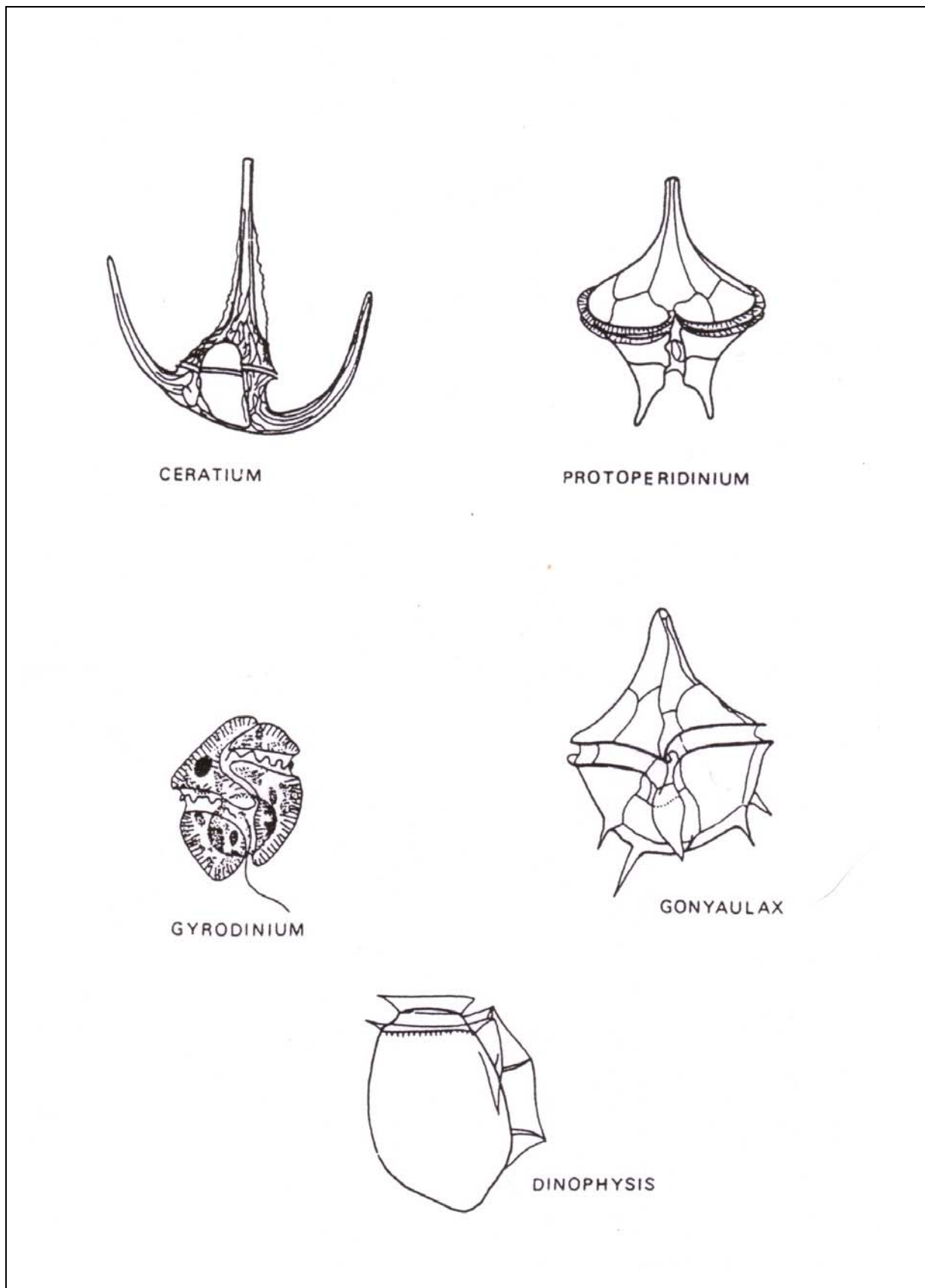


Figure 2 : Principaux genres de dinoflagellés (d'après Sournia, 1986).

2. Les efflorescences algales

La problématique :

Depuis quelques années, sur le littoral de nombreux pays, un phénomène lié aux micro-algues planctoniques productrices de toxines génère des problèmes environnementaux, économiques et de santé publique. Ce phénomène est caractérisé par une prolifération massive ou "efflorescence" périodique et inexplicée d'algues productrices de toxines (Nézan et Piclet, 1989 ; Aubert, 1990 ; Anderson, 1994). En effet, certaines micro-algues produisent des toxines qui provoquent soit des lésions ou des brûlures cutanées à la suite d'un contact avec la peau des baigneurs, soit des troubles digestifs ou nerveux plus ou moins graves dus à la consommation de fruits de mer contaminés.

Ces proliférations entraînent des contaminations de coquillages (moules, huîtres, etc.). Elles constituent un problème de santé publique et ont d'importantes répercussions économiques liées à l'interdiction de la vente des produits contaminés.

De nombreux spécialistes pensent que ces "blooms" ou efflorescences deviennent de plus en plus graves et fréquentes : le nombre de cas dus à des espèces nuisibles, les dégâts et les accidents qui en résultent, les types de toxines et d'espèces toxiques et le nombre de produits contaminés ont apparemment augmenté (Anderson, 1994).

2.1. Les phénomènes d'eaux colorées

L'apparition d'une efflorescence phytoplanctonique est un phénomène naturel qui survient surtout pendant la période estivale, en raison des conditions locales favorables à la prolifération intense d'un organisme dominant. En effet, il se produit une sélection d'ordre physiologique d'une ou de quelques espèces en fonction des conditions particulières du milieu (Figure 3).

La présence d'eau colorée n'est pas forcément corrélée à la toxicité pour l'homme ou pour les animaux marins, de même qu'une absence de coloration anormale n'est pas la preuve d'une non toxicité.

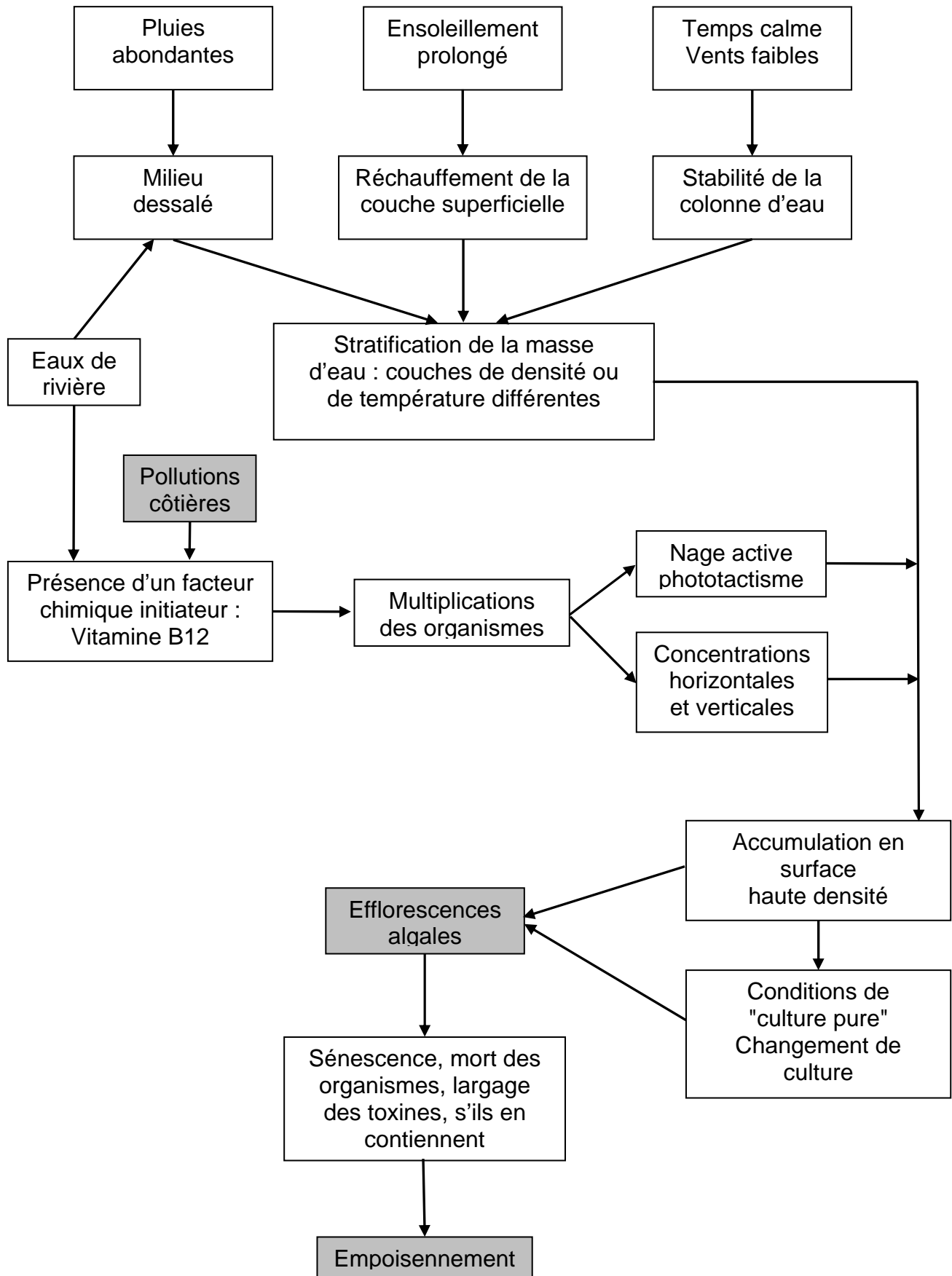


Figure 3 : Schéma général des causes hypothétiques des efflorescences algales (Berthome, 1985)

2.1.1. Les organismes responsables

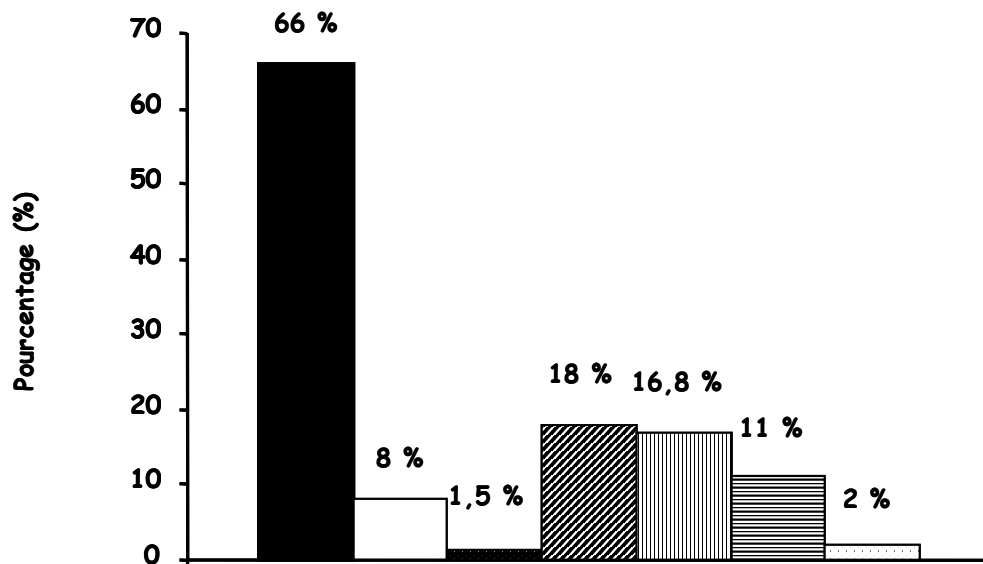
Les premières études ont été réalisées par Baker en 1753. Le premier organisme qu'il décrivait était une algue bioluminescente du genre *Noctulia* (Dodge, 1984) dont Slabber effectua les premières illustrations en 1778.

Les organismes responsables de ces phénomènes sont le plus souvent des dinoflagellés (75% des cas).

Parmi ceux qui n'y appartiennent pas, nous retrouvons :

- Des bactéries marines en particulier le genre *Rhodopseudomonas*.
- Des Cyanophycées.
- D'autres flagellés comme les haptophycées et les cryptophycées.
- Des ciliés
- Des crustacés très pigmentés en particulier des copépodes.
- Des diatomées.

La figure 4 montre la fréquence des différents groupes phytoplanctoniques dans les efflorescences algales. Les concentrations de ces organismes peuvent atteindre des dizaines de millions de cellules par litre, ceci pouvant entraîner une très forte coloration de l'eau de mer.



- Dinoflagellés non toxiques
- Dinoflagellés toxiques pour les animaux
- Dinoflagellés toxiques pour l'homme
- ▨ Diatomées
- ▤ Phytoflagellés
- ▧ Ciliés
- ▩ Indéterminés

Figure 4 : Fréquences des principaux groupes phytoplanctoniques dans les efflorescences algales (d'après Berthome, 1985).

2.1.2. Les facteurs de déclenchement

Dans l'environnement les phénomènes interagissent, dans un équilibre écologique presque parfait. Lorsque cet équilibre est rompu pour des raisons naturelles ou à cause de l'activité humaine, il peut y avoir des effets néfastes pour l'environnement et pour la vie humaine.

Ainsi l'apparition d'eaux colorées est due en général à deux types de phénomènes. D'une part une multiplication importante des organismes planctoniques favorisée par des facteurs hydrologiques, climatiques et chimiques, d'autre part une concentration de ces organismes due généralement à des facteurs physiques, météorologiques ou hydrologiques (Berthome et *al.*, 1985 ; Lassus, 1989).

La température

Les eaux colorées apparaissent après une période assez prolongée de températures élevées de l'air et de l'eau qui coïncide avec l'absence d'agitation de la masse d'eau. En effet, un milieu homogène va permettre à l'espèce la plus apte à coloniser ce milieu, de l'occuper entièrement, et d'exclure par compétition les autres espèces. *A contrario*, en conditions perturbées (vent par exemple), l'hétérogénéité de l'espace permettra à des espèces différentes de coexister en relation avec leurs capacités relatives à coloniser ces différents espaces.

C'est une condition presque constante. Cette période ne correspond pas forcément au moment le plus chaud de l'année, mais à un moment de remontée assez régulière mais rapide de la température des eaux (Pincemin, 1969).

La salinité

Par ailleurs, les eaux colorées apparaissent également lors d'un abaissement de salinité dû à une forte pluviosité précédant le phénomène. Une stratification prolongée des eaux (temps calme, réchauffement de la couche superficielle, dilution (pluies et rivières)) semble davantage nécessaire que la variation de salinité.

Les sels nutritifs

L'apport de sels nutritifs est un des facteurs favorables au déclenchement des eaux colorées. Ces sels nutritifs proviennent soit d'un "upwelling" (remontée d'eau froide profonde apportant des éléments nutritifs vers la surface), soit d'un drainage important après une forte pluie.

En effet, une forte concentration d'azote et de phosphore est nécessaire au développement du phytoplancton. Cependant, il existe des zones totalement dépourvues d'apports en ces nutriments, où se développe du phytoplancton.

Toutes ces conditions favorisent, dans un premier temps, la multiplication intense des diatomées qui ont besoin de quantités importantes de sels nutritifs. Ceci se produit généralement à la fin du printemps et conduit à la formation des eaux rouges à diatomées. Par la suite, après la disparition quasi-totale des diatomées qui est corrélée avec celle des sels nutritifs, la prolifération massive des dinoflagellés intervient et atteint son maximum. En effet, les dinoflagellés peuvent se développer à des concentrations très faibles de nitrates et de phosphates, sels nécessaires à la multiplication du phytoplancton.

Le pH

Il a été démontré que les eaux colorées à dinoflagellés se développent à des pH compris entre 7,8 et 8,4 qui correspond au pH normal de l'eau de mer (Amzil, 1993).

Divers

Les pesticides, et en particulier les herbicides ont certainement un effet sélectif sur les phytoplanctons, certaines espèces étant détruites alors que d'autres sont plus résistantes ce qui a pour conséquence de libérer des niches et de profiter ainsi à la prolifération des phytoplanctons résistants (Amzil, 1993).

2.1.3. Fin du phénomène

Après leur prolifération, les dinoflagellés peuvent se déplacer facilement vers la surface (ensoleillement maximal) grâce à leurs flagelles. Ceci n'est pas le cas des diatomées qui ont besoin d'une mer agitée pour se maintenir dans la couche superficielle, ce qui peut expliquer leur disparition en l'absence de vents nécessaire à l'apparition des dinoflagellés.

Les efflorescences disparaissent au bout de quelques jours, quand les conditions favorables à la prolifération des dinoflagellés ne sont plus réunies. La disparition du phénomène est observée à la suite d'une insuffisance d'éléments nutritifs, d'une baisse de la température des eaux...

Les dinoflagellés subissent alors une perte de leur mobilité suivie en général d'une sédimentation sous forme de kystes prêts à se transformer à nouveau lorsque les conditions redeviendront favorables.

Il peut y avoir aussi l'intervention de prédateurs, en particulier d'autres dinoflagellés comme *Noctiluca scintillans*, *Oxyrrhis marina* et *Polykrikos schwartzii* (Pincemin, 1995).

2.2. Les efflorescences à caractère toxique

Les efflorescences phytoplanctoniques se produisent spontanément dans les estuaires et au bord des côtes, du printemps à l'automne, provoquant parfois un changement de couleur de la mer : phénomène d'eaux colorées.

Parmi les eaux colorées (les couleurs peuvent varier du jaune au rouge, ou encore au vert), nous pouvons distinguer:

- Les efflorescences nuisibles par des algues non toxigène.
- Les efflorescences productrices de toxines.

Les eaux colorées non nuisibles notamment à noctiluques qui sont non toxiques peuvent toutefois être assez spectaculaires :

2.2.1. Les efflorescences nuisibles par des algues non toxigènes

Dans ces eaux colorées nuisibles, il n'y a pas de toxines produites, mais par contre sont présents des organismes qui produisent du mucus. Ainsi, *Phaeocystis spp* constitue une colonie formée d'un grand nombre de cellules contenues dans une boule muqueuse. Ces boules muqueuses peuvent mesurer jusqu'à 1 à 2 mm.

En période printanière, sur le littoral nord, un phénomène de mousses assez incommodantes pour leurs effets sur les eaux de baignade et sur l'environnement général des plages, peut être observé.

D'autre part, une importante production de biomasse algale avec une importante consommation d'oxygène en particulier pendant la nuit entraîne une anoxie du milieu. L'une des conséquences sera la mortalité de poissons qui sont les vertébrés les plus

sensibles à la chute d'oxygène dissout (mort de poissons en Loire Atlantique, mais aussi en baie de Vilaine à cause d'efflorescences d'*Oxyrrhis marina* en 1982) (Lagoin, 1991).

Les poissons ne sont pas les seuls touchés comme cela a pu être constaté dans le Morbihan avec la mort d'huîtres en 1979 due à des dinoflagellés du genre *Proto-peridinium*.

Dans ces eaux colorées nuisibles, des organismes possédant des épines peuvent également provoquer une mortalité d'espèces de la faune marine.

2.2.2. Les efflorescences productrices de toxines.

Certains dinoflagellés synthétisent et excretent des toxines. Leurs efflorescences peuvent alors être soit directement toxiques pour les organismes marins soit toxiques pour les consommateurs de coquillages.

La toxicité directe est rare. Il s'agit d'intoxication au contact de l'eau contenant des toxines ou la respiration d'aérosols contenant des cellules lysées et donc des toxines.

La toxicité indirecte est beaucoup plus fréquente, elle se fait *via* la chaîne alimentaire, de manière courte, ou de manière plus complexe.

La toxicité *via* une chaîne alimentaire courte est de type phytoplancton/bivalve (cas le plus fréquent) ou phytoplancton/poisson herbivore et va concerner aussi bien des toxines hydrosolubles que liposolubles.

Les toxines hydrosolubles s'accumulent dans les viscères des animaux contaminés, alors que les toxines liposolubles sont supposées pouvoir diffuser dans d'autres organes et donc favoriser des facteurs de bioconcentration.

Ainsi, nous retrouvons dans ce groupe :

- Les phycotoxines diarrhéiques avec plusieurs espèces du genre *Dinophysis* et du genre *Prorocentrum*.
- Les phycotoxines paralysantes avec un grand nombre d'espèces décrites depuis de nombreuses années : *Alexandrium*, *Pyrodinium bahamense*, *Gymnodium catenatum*.
- Les phycotoxines amnésiantes dont les producteurs sont essentiellement les diatomées en ce qui concerne le phytoplancton.

- Et enfin les toxines ciguatériques, avec essentiellement *Gambierdiscus toxicus*.

De nouvelles toxines ou nouveaux organismes producteurs de toxines sont apparus (espèces émergentes) :

Lingulodinium polyedra producteur d'homoyessotoxine, mais aussi de saxitoxine et de toxines de type toxine paralysante.

Protoceracium reticulatum, producteur de yessotoxine

Ostreopsis spp, producteurs d'ostreocynes, d'analogue de la palytoxine et d'ostreotoxine (neurotoxines).

La toxicité via des chaînes alimentaires plus complexes concerne les toxines hydrosolubles du type Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) ou Intoxication paralysante par les fruits de mer (IPFM) et de type ASP (Amnesic Shellfish Poisoning) ou IAFM (Intoxication amnésiantes par les fruits de mer). Il s'agit de toxines accumulées par des prédateurs de bivalves divers : gros crustacés, gastéropodes carnivores par exemple. La contamination peut alors se faire par les bivalves, les prédateurs intermédiaires comme le bussin, le zooplancton herbivore lui-même consommé par du zooplancton carnivore puis par des poissons planctonophages, des poissons en fin de chaîne, ou par les oiseaux et mammifères marins (Lassus, 2003).

DEUXIEME PARTIE :

**LES INTOXICATIONS A TOXINES
DIARRHEIQUES**

1. Introduction

Les toxines diarrhéiques sont produites par des dinoflagellés, elles peuvent s'accumuler dans les hépatopancreas des bivalves sans troubles pour ces derniers et provoquer des intoxications de type gastro-entérites chez les consommateurs de ces coquillages. Ce syndrome est connu sous la dénomination anglo-saxonne de Diarrheic Shellfish Poisoning (DSP). Un nom et une abréviation française ont été également donnés : Intoxication Diarrhéique par Fruits de Mer (I.D.F.M.).

Les intoxications diarrhéiques ne sont pas un phénomène nouveau même si elles n'ont été reconnues en France officiellement qu'en 1983. Elles sont liées à des efflorescences de dinoflagellés toxiques du genre *Dinophysis* et elles ont provoqué, la même année, jusqu'à 3300 cas de gastro-entérites (déclarées) en Bretagne sud.

Que ce soit dans l'océan Pacifique, dans l'océan Indien ou dans l'océan Atlantique, des relations ont été établies entre la présence des dinoflagellés producteurs de toxines diarrhéiques (*Dinophysis* spp., *Prorocentrum* spp.) et la contamination des coquillages par ces toxines (Amzil, 1993) (Figure 5 et 6).

Depuis, la toxine responsable a été identifiée : en France, c'est principalement l'acide okadaïque, tandis qu'au Japon et en Amérique du Nord c'est surtout un dérivé méthyli de l'acide okadaïque, la dinophysistoxine-1 (DTX-1). En Irlande, c'est la Dinophysistoxine-2 (DTX-2). Cependant, des variations saisonnières et régionales de la toxicité, et donc du profil toxinique, peuvent être observées (Yasumoto et *al.*, 1980 ; Masselin et *al.*, 1992 ; Amzil, 1993 ; Wright & Cembella, 1998).

2. Toxines responsables : L'acide okadaïque et ses dérivés.

2.1. L'acide okadaïque.

2.1.1. Historique

Les premiers cas d'intoxications diarrhéiques liés à la présence de *Dinophysis* dans les eaux ont été signalés en 1961, aux Pays-Bas, après consommation de moules. Le même phénomène s'est renouvelé en 1971, 1976, 1979 et 1981. L'agent responsable était toujours *Dinophysis acuminata* provoquant 25 à 100 cas d'intoxications.

En Espagne, les premiers cas ont été observés en 1978, 1979, et 1981 donnant 5000 intoxications. Les espèces impliquées étaient *D. caudata*, *D. rotundata* et surtout *D. acuminata*, *D. acuta* (Fraga et al., 1984).

En Norvège, ce n'est qu'en 1984 que les *D. acuta* et *D. norvegica* ont été identifiés comme étant responsables des intoxications de plusieurs centaines de personnes (Underbal et al., 1985).

En Suède, les premiers cas ont été observés en 1983, mais ce n'est qu'en 1984 que le lien entre les intoxications et la présence de *D. acuta*, *D. norvegica*, et *D. acuminata* a été établie (Krogh et al., 1985).

Au Japon, en 1976 et 1977, 164 personnes présentaient des symptômes d'intoxications liées à la consommation de moules et de coquilles Saint-Jacques. En 1980, Yasumoto a identifié l'espèce *D. fortii* comme l'agent responsable de ces intoxications (Yasumoto et al., 1980 ; Amzil, 1993).

Aux Etats-Unis, 31 cas en 1980 et 1951 cas en 1983 ont été recensés dans la région de New York et du New Jersey (Stamman et *al.*, 1987). Les espèces responsables étaient *D. acuminata*, *D. acuta* et *D. norvegica* présentes dans les eaux de l'Etat du Maine (Freudenthal & Jijina, 1988).

En France, 3300 cas en 1983 et 2000 cas en 1984 et depuis le phénomène se renouvelle chaque fois que la densité de *Dinophysis sp.* atteint un seuil de 200 cellules/litre (Marcaillou-Le Baut, 1985 ; Belin & Berthome, 1992).

2.1.2. Répartition

Le genre *Dinophysis* est largement représenté dans presque toutes les mers du globe et en particulier dans les zones côtières. *Dinophysis* n'est pratiquement jamais associé à des phénomènes d'eaux colorées, car les concentrations cellulaires ne dépassent que très rarement 100 000 cellules par litre (Lassus et *al.*, 1991).

La connaissance du cycle biologique de *Dinophysis* et des facteurs du milieu nécessaires à sa croissance comporte encore beaucoup d'inconnues, essentiellement en raison de l'impossibilité actuelle de le cultiver en laboratoire. Certaines conditions nécessaires au développement de *Dinophysis* ont cependant été identifiées, telles que la stratification des masses d'eau. Des modèles mathématiques ont permis de valider l'hypothèse du rôle majeur de la turbulence verticale dans l'inhibition de son développement.

L'hypothèse de proliférations au large, avant que les côtes ne soient touchées, a été étayée par les résultats des campagnes menées dans le Pertuis Charentais de 1989 à 1991 (Delmas et *al.*, 1993) : l'établissement d'une thermocline et d'une stratification stable de la colonne d'eau se produiraient en effet au large avant de se produire au niveau des côtes.

D'après Maestrini et al (1999), les cellules de *Dinophysis* sont le plus souvent concentrées dans une couche qui représente une faible fraction de la colonne d'eau, laquelle est alors verticalement stratifiée. Ainsi, les populations de *Dinophysis* se révèlent souvent plus abondantes au niveau de la thermocline.

Si certaines espèces de *Dinophysis* sont véritablement autotrophes, c'est-à-dire capables de synthétiser leur propre substance organique par photosynthèse, la plupart des espèces côtières pourraient avoir en plus une capacité hétérotrophe et/ou phagotrophe : leur substance organique est alors produite par l'assimilation de substances organiques dissoutes (hétérotrophie stricte), ou par l'assimilation directe de proies (phagotrophie).

Des recherches récentes ont mis en évidence l'existence de corpuscules de type kyste de résistance pour *D. acuminata*, mais aucune observation de désenkystement n'a pu être effectuée.

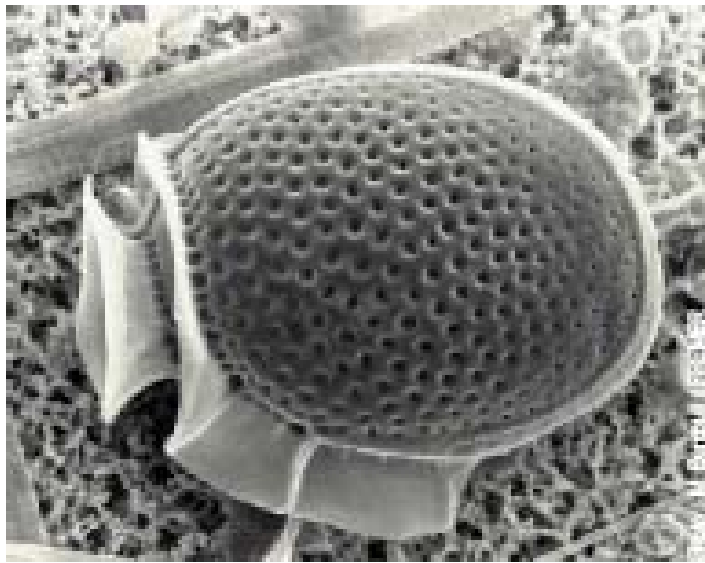


Figure 5 : *Dinophysis acuminata* (M.E.B.)

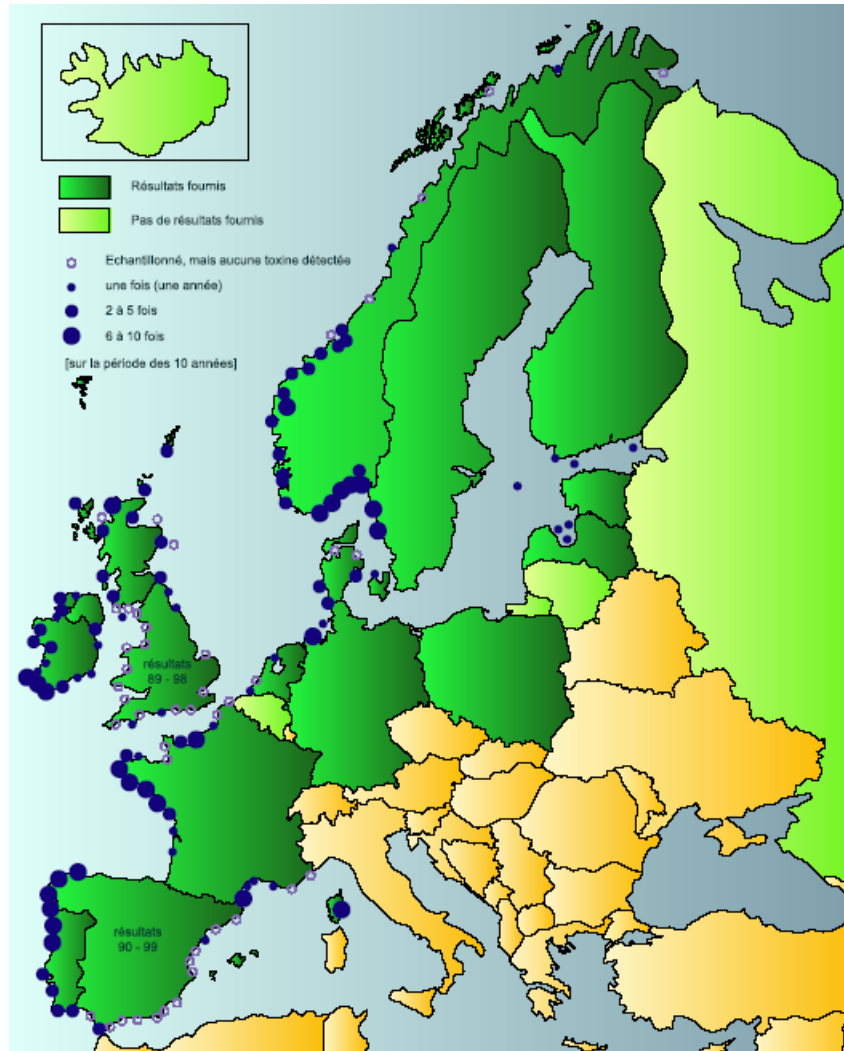


Figure 6 : Présence de toxine DSP en Europe (Période 1993-2002)
 (Source IFREMER)

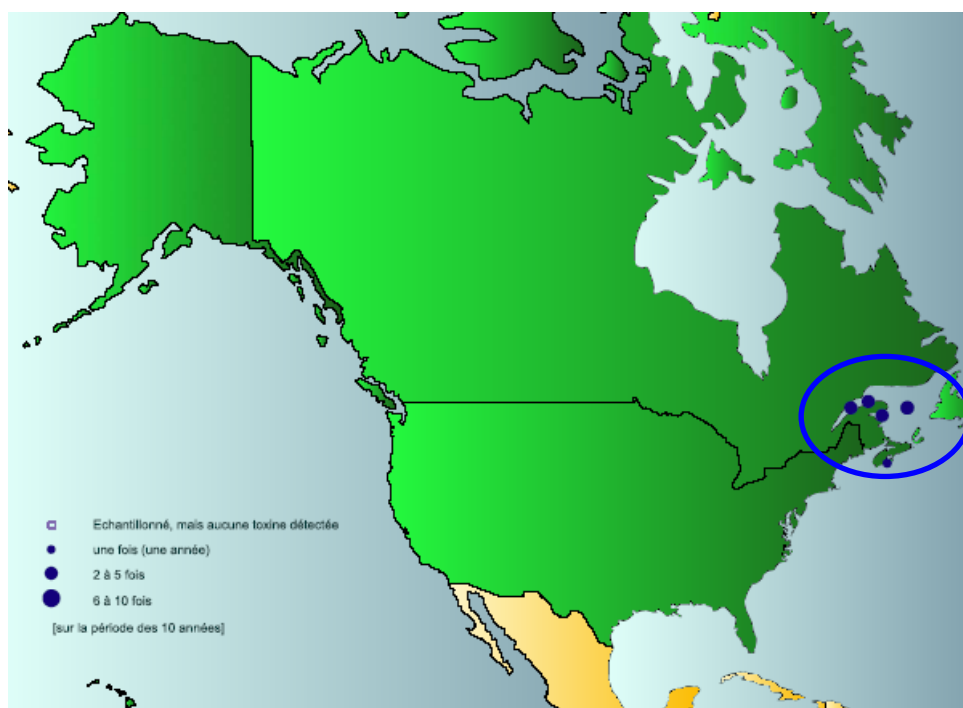


Figure 7 : Présence de toxine DSP en Amérique du nord (Période 1993-2002)
 (source IFREMER)

2.1.3. Structure et propriétés physico-chimiques de l'acide okadaïque

L'acide okadaïque (AO) est une toxine marine produite par deux types d'organismes, les dinoflagellés (*Dinophysis* spp. et *Prorocentrum* spp.) et les éponges *Halichondria okadaï*, provenant de la côte Pacifique du Japon, et l'espèce *Halichondria melanodacia* de Floride (Tachibana et *al.*, 1981).

L'acide okadaïque est un polyether d'acide gras dont la formule brute est $C_{44}H_{50}O_{13}$, de poids moléculaire 804 et dont la formule développée a été déterminée par diffraction aux rayons X (Tachibana et *al.*, 1981) (Figure 8).

Sa dose létale 50 (DL50) est de 192 $\mu\text{g}/\text{kg}$ chez la souris et son effet toxique aigu apparaît pour des doses d'acide okadaïque au dessus de 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Tachibana et *al.*, 1981). C'est donc une substance très toxique.

Il se présente sous forme d'une poudre blanche cristalline et son point de fusion se situe entre 164 et 166°C (Tachibana et *al.*, 1981). Il est stable à -20°C pendant plusieurs mois dans une solution d'éthanol. Son maximum d'absorption dans l'U.V. est aux environs de 210 nm.

Nam et *al.* (1990), ont montré le caractère hydrophobe de l'acide okadaïque en étudiant son extraction d'une solution tampon par différents solvants organiques, et sa partition dans les couches lipidiques.

Les structures chimiques des dérivés de l'acide okadaïque ont été déterminées à la suite de la purification et de l'élucidation structurale de cet acide. La DTX-1 est en effet un dérivé méthylé de l'acide okadaïque (35-méthyl AO) (Murata et *al.*, 1982). Il existe également la DTX-2 qui est un isomère de l'acide okadaïque (James et *al.*, 1998).

Les composés acide okadaïque, DTX-1, DTX-2 peuvent faire l'objet d'une acylation au niveau de l'hydroxyle du carbone 7 de la molécule (7-O-AO/DTXs) qui se traduit par la fixation de chaînes d'acides gras saturés ou insaturés (acyles) conduisant à

la formation d'un groupe de dérivés toxiques appelés les acyles-esters (DTX-3) (Figure 8).

La toxicité de ces derniers dépend du degré de saturation de l'acide gras impliqué dans l'acylation. Ces dérivés ont été isolés uniquement à partir des glandes digestives de coquillages contaminés et n'ont pas été détectés dans le phytoplancton. Il semblerait qu'ils se forment dans les coquillages (Yasumoto et *al.*, 1985 ; Ifremer, 2003).

La figure 8 regroupe les structures de l'acide okadaïque et de ses dérivés.

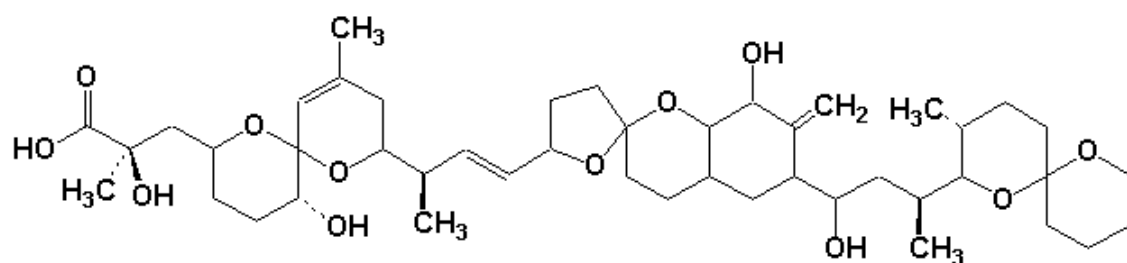


Figure 8 : Structure de l'acide okadaïque

2.1.4. Propriétés biochimiques

2.1.4.1. Mécanismes d'action

Les protéines phosphatases 1 et 2A ont un spectre large et assez similaire. Il est possible de les différencier par la vitesse de réaction avec certains substrats comme les chaînes légères de la myosine et l'ATP citrate lyase. Ce sont les deux unités catalytiques ayant une activité significative sur la phosphorylase dans les tissus des mammifères.

L'acide okadaïque est connu pour inhiber la déphosphorylation des chaînes légères de la myosine, ce qui entraîne l'inhibition de l'activité des phosphoprotéine phosphatase 1 et 2A (PP1 et PP2A), protéines sérine/thréonine phosphatase impliquées dans la régulation cellulaire (Honkanen *et al.*, 1994).

En tant qu'inhibiteur spécifique des phosphatases de type 1 et de type 2A cette toxine s'avère être un outil intéressant pour identifier des processus biologiques régulés par la phosphorylation des protéines (Cohen *et al.*, 1990).

Son pouvoir inhibiteur est plus important sur la protéine phosphatase 2A (1nM d'AO) que sur la protéine phosphatase 1 (1 μ M d'AO) (Biolojan et Takai, 1988).

L'acide okadaïque inhibe l'activité des enzymes responsables de divers métabolismes intracellulaires comme les effets contractiles, la régulation de la transcription des gènes, le maintien du cyto-squelette, la régulation de la transduction et la division cellulaire (Puech L., 2000).

L'inhibition de l'activité des sous-unités ribosomiques en présence de la toxine (l'inhibition de la déphosphorylation du facteur d'élongation EF-2), est un fait bien établi. Les mutations causées par l'acide okadaïque dans les cellules CHL (Chinese Hamster Lung) sont dues à des transformations du EF-2 (Aonuma *et al.*, 1991). De plus, cet inhibiteur de la protéine phosphatase 2A, a été utilisé pour augmenter la phosphorylation du facteur eEF-2 par la protéine kinase III spécifique du facteur et la phosphorylation du facteur ribosomique acide P1 et P2 par une caséine kinase.

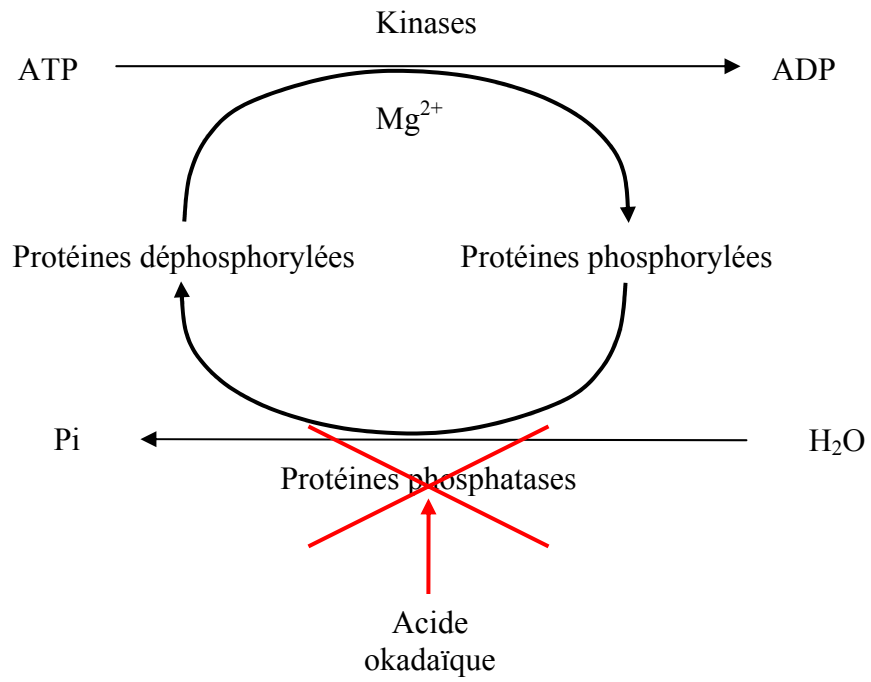


Figure 9 : Mécanisme d'action de l'acide okadaïque et ses dérivés au niveau moléculaire : inhibition des protéines phosphatases

En effet, aussi bien eEF-2 que P1 P2 sont déphosphorylés par cette protéine phosphatase (Reboud, 1996). Comme la phosphorylation de eEF-2 inhibe complètement l'activité du facteur et donc empêche la translocation, il est possible que l'acide okadaïque inhibe la synthèse protéique.

Le mécanisme de régulation des kinases joue un rôle important dans le métabolisme intracellulaire. Mc Ilvain et *al.*, 1994 ont montré que ce complexe protéique subit une hyperphosphorylation, ce qui entraîne son inhibition.

L'étude de la capacité de liaison de l'acide okadaïque à la protéine phosphatase a montré qu'il y a une bonne corrélation entre la liaison de la toxine à la protéine phosphatase et son activité (Takai et *al.*, 1992).

2.1.4.2. Effet diarrhéique de l'acide okadaïque

Les toxines de type acide okadaïque provoquent une accumulation de fluide dans l'intestin grêle en agissant sur la perméabilité vasculaire au bout d'une période d'incubation très courte.

Edebo (1989) a constaté un gonflement rapide de l'épithélium intestinal du rat accompagné d'une hypersécrétion de fluide à la suite de l'application d'acide okadaïque et d'un extrait de moules contaminées par ce type de toxine (Edebo et *al.*, 1989). Cette étude a été confirmée sur des intestins de souris et sur organes isolés (tronçon d'intestin de lapin et de souris). Des standards de DTX-1 et DTX-3 sur le même matériel conduisent à la même observation. La DTX-3 serait plus toxique que l'AO et la DTX-1 (Edebo et *al.*, 1989). Terao a observé une augmentation de la perméabilité des vaisseaux intestinaux après injection de la DTX-1 dans la cavité péritonéale des souris (Terao et *al.*, 1986).

Les études histopathologiques de tronçons d'intestins traités avec l'acide okadaïque, ses dérivés ou par des extraits de moules contaminées par ces toxines ont montré une dégénérescence de l'épithélium intestinal. La DTX-1 provoque des lésions sévères de la muqueuse intestinale une heure après son injection. Les études de changement ultra-structural au niveau intestinal ont conduit à l'observation d'une extravasation (séparation anormale entre les cellules épithéliales et la membrane basale), une dégénérescence de l'épithélium absorbant intestinal et une desquamation de l'épithélium muqueux à partir de la surface villositaire (Terao et *al.*, 1986).

L'acide okadaïque est également un agent contractant des muscles lisses, cet effet intervient probablement dans le déclenchement des diarrhées, des douleurs abdominales et des vomissements. En effet, il a été montré que l'acide okadaïque provoquait une contraction durable des muscles lisses dans les artères ombilicales humaines avec une gamme de concentration allant de 5.10^{-7} à 10^{-4} M. La même action contracturante a été observée avec l'aorte de lapin ainsi qu'au niveau du muscle lisse isolé de l'intestin grêle du cobaye (Shibata et *al.*, 1982).

2.1.4.3. Activité promotrice tumorale

Après avoir constaté une fréquence accrue des cancers de l'estomac chez les consommateurs de bivalves contaminés contenant de l'acide okadaïque, de la DTX-1 et/ou de la DTX-3, dans divers pays (Japon, Chili, Norvège, Hollande, Espagne), Fujiki en 1987 a testé l'acide okadaïque et la DTX-1 sur l'irritation de l'oreille de la souris, test de dépistage des promoteurs tumoraux. Les substances promotrices tumorales provoquent en effet l'induction d'une enzyme dans l'épiderme de la souris, l'ornithine décarboxylase.

In vitro l'acide okadaïque induit des condensations chromosomiques prématurées (Yamashita et *al.*, 1990) et une action suppressive sur le facteur MPF (Mitosis-Promoting-factor) (Paulson et *al.*, 1994). Cependant, l'effet cytologique de la toxine entraîne la rupture de l'enveloppe nucléaire et la répartition du cytoplasme et du nucléoplasme de façon atypique. Quelques microtubes apparaissent mais sont disposés

anarchiquement. Il semble donc que l'acide okadaïque dérègle l'organisation des fuseaux méiotiques alors que le MPF induit par la toxine paraît identique au MPF normal (Rime et *al.*, 1990).

Aonuma et *al.*, (1991) ont recherché la mutagénicité de l'acide okadaïque. Il n'induit pas de mutations chez *S. typhimurium*; en revanche il est très mutagène vis-à-vis des cellules CHL (Chinese Hamster Lung) même sans activation enzymatique microsomiale. Ce qui indique que la toxine non métabolisée est mutagène dans un tel système.

L'effet cytotoxique de l'acide okadaïque a été étudié sur des cellules MacCoy (cellules épithéliales de l'intestin humain) par Baldacine et *al.*, (1993) dans une période de 3 heures d'incubation avec l'acide okadaïque, les cellules présentant une forme arrondie et d'importantes modifications morphologiques sont observées après 18 heures d'incubation. Les modifications morphologiques induites par l'acide okadaïque dans les cellules de mammifères sont typiques de l'apoptose.

2.1.5. Signes cliniques d'une intoxication diarrhéique causée par l'acide okadaïque

Les signes cliniques de l'intoxication diarrhéique apparaissent trois à cinq heures après l'ingestion de coquillages contaminés. Il s'agit d'une gastro-entérite sévère accompagnée de douleurs abdominales et, dans la moitié des cas environ, de nausées et même de vomissements (Freudenthal and Jijina, 1988).

Selon la susceptibilité du malade, des signes généraux sont observés comme des vertiges, de la fièvre, et parfois des troubles cardiaques légers. Cette gastro-entérite régresse normalement dans les trois jours.

2.2. Toxines associées

L'appellation "toxines diarrhéiques" comprend différents composés qui sont des polyethers cycliques, moyennement polaires (liposolubles) se repartissant en trois familles : les dinophysis toxines (DTXs) à fonction acide carboxylique dont la principale est l'acide okadaïque, les pecténotoxines (PTXs), macrolides neutres et les yessotoxines (YTXs), toxines sulfatées. Une autre famille de toxines diarrhéiques, les azaspiracides (AZAs), a été isolée récemment à partir des coquillages en Irlande.

L'ensemble de ces toxines est soluble dans l'acétone, le dichlorométhane, le chloroforme et le méthanol. C'est pourquoi, les DTXs, PTXs, et les YTXs ont été regroupées dans une même catégorie car elles possédaient des propriétés physico-chimiques voisines. L'appellation "toxines diarrhéiques" est en fait peu appropriée car ces différentes toxines ont des activités biologiques diverses.

2.2.1. Les pecténotoxines (PTXs)

Les pecténotoxines sont, comme les DTXs, des polyethers. Elles sont chimiquement neutres et ont un squelette de base commun (Figure 10). Elles ont été isolées à partir de coquillages japonais (palourdes, pétoncles) : PTX-1, PTX-2, PTX-3 et PTX-6 de poids moléculaire 874, 858, 872, et 888 respectivement (Yasumoto et *al.*, 1989).

La PTX-2 est la seule toxine, de la famille des PTXs, détectée chez l'espèce japonaise *Dinophysis fortii*, en plus de la DTX-1, au Japon (Lee et *al.*, 1989) puis récemment en Italie (Draisci et *al.*, 1996). D'après Yasumoto et *al.*, (1989) et Suzuki et *al.*, (1998), il semblerait que le groupe méthyle du carbone 43 de la PTX-2 subisse une série d'oxydation dans l'hépatopancréas des coquillages, donnant les autres pecténotoxines. Elles sont néanmoins produites en faible quantité et sont essentiellement hépatotoxiques.

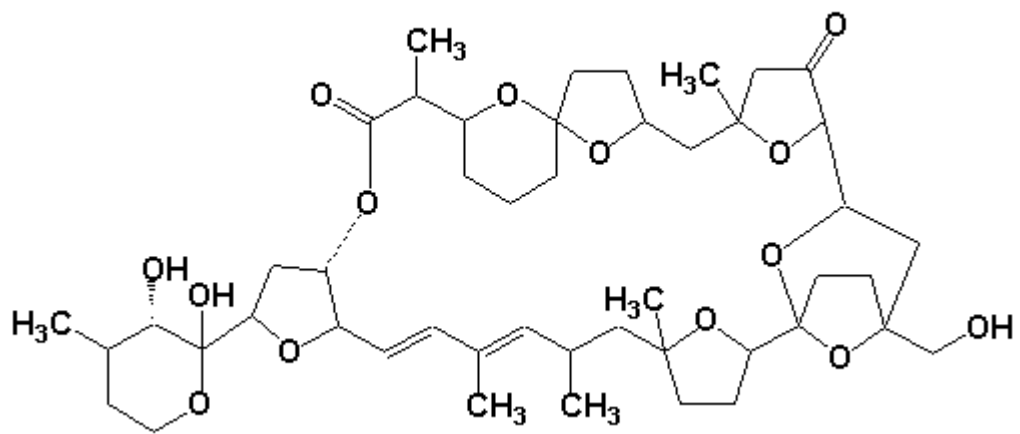


Figure 10 : Structure des pecténotoxines.

Récemment, de nouveaux homologues de la PTX-2-l'acide séco-pecténotoxine-2 (PTX-2SA) et son épimère : acide 7-épi-séco-pecténotoxine-2 (7-épi-PTX-2SA)- ont été isolés à partir des moules de Nouvelle-Zélande. L'identification de ces composés a été liée à des efflorescences de *D. acuta*. En fait, dans les coquillages, c'est l'acide séco-PTX-2 et son épimère qui dominant alors que, dans le phytoplancton (*D.acuta*), c'est la PTX-2 qui est majoritaire. Il semble qu'il s'agisse d'une bioconversion de la PTX-2 en acide séco-PTX-2 dans les coquillages (Suzuki et *al.*, 2001).

2.2.2. Les yessotoxines (YTXs)

Les yessotoxines (YTXs) ont été isolées à partir d'une coquille Saint-Jacques *Patinopecten yessoensis* au Japon. Ce groupe de polyethers sulfatés, comprend la yessotoxine, YTX, (C₅₅H₈₀O₂₁S₂Na₂, poids moléculaire 1186) et la 45-hydroxy-YTX (C₅₅H₈₀O₂₂S₂Na₂, 1202). Ces dernières ont été retrouvées dans les moules de Norvège, dans la région de Sogndal (Murata et *al.*, 1987 ; Lee et *al.*, 1989).

La présence de la YTX a été mise en évidence plus tard dans les bivalves et le phytoplancton au Chili, en Nouvelle-Zélande et en Italie, indiquant l'extension de ce type de contamination. La YTX a été identifiée comme étant la toxine majeure dans les coquillages de la mer Adriatique, qui contiennent également deux nouveaux homologues de la yessotoxine : l'homoYTX, la 45-hydroxyhomo-YTX, la carboxy-YTX et l'adriatoxine (ATX) (Ifremer, 2003).

La figure 11 regroupe les structures de la yessotoxine et de ses dérivés.

L'origine phytoplanctonique des yessotoxines n'a été prouvée que récemment. Différents travaux conduits séparément ont montré que c'est le dinoflagellé *Protoceratium reticulatum* qui est responsable de la contamination des coquillages par les YTXs (Satake et *al.*, 1997) en Nouvelle-zélande, tandis que *Lingulodinium polyedra* produirait l'homo-YTX en Italie.

Bien que généralement classées dans le groupe des toxines diarrhéiques, les yessotoxines ne provoquent pas des diarrhées et ne sont pas des inhibiteurs des protéines phosphatases. Leur toxicité pour l'homme n'a jamais été démontrée (Yasumoto et Satake, 1998).

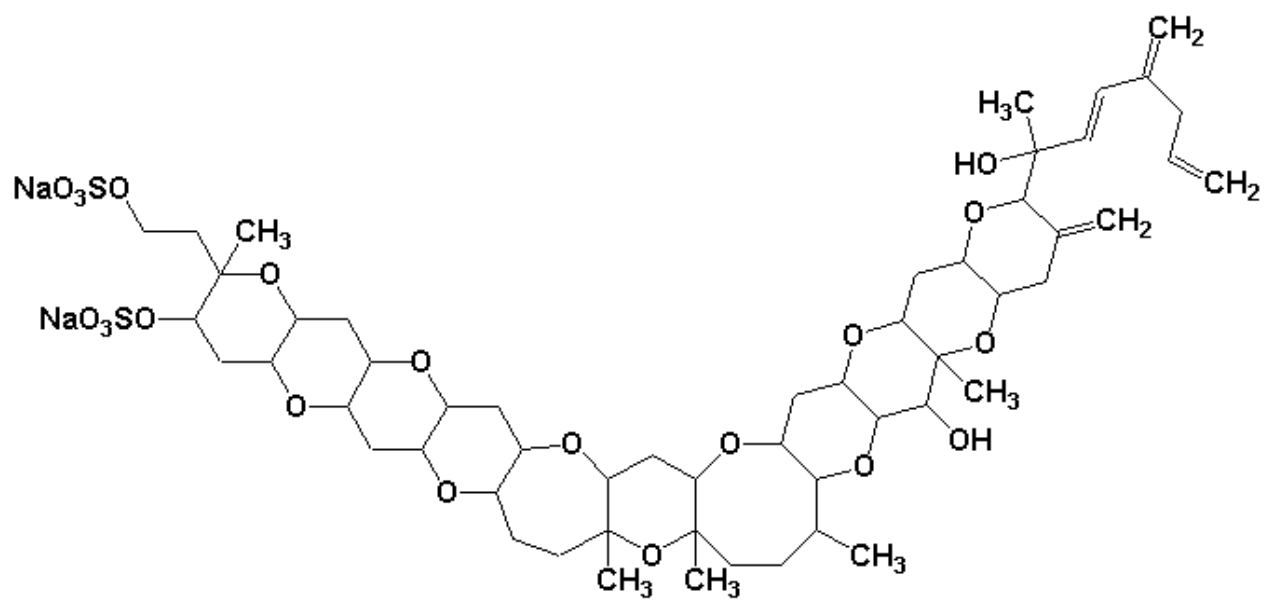


Figure 11 : Structure de la yessotoxine.

2.2.3. Les azaspiracides (AZAs)

En 1994, des intoxications humaines inexplicables avec des symptômes de type diarrhéique ont été signalées à la suite de la consommation de coquillages à Killary en Irlande. La recherche des toxines diarrhéiques par les méthodes physico-chimiques a révélé des traces d'acide okadaïque et son dérivé la DTX-2, qui n'expliquaient pas la forte toxicité des extraits de coquillages sur souris.

Des travaux de purification entrepris à partir des coquillages ont abouti à l'isolement de la famille des azaspiracides qui est composée de trois toxines.

Ce sont des polyethers présentant une fonction acide carboxylique et une fonction imine cyclique. Il s'agit de l'azaspiracide-1 (AZA-1, $C_{47}H_{71}O_{12}$ de poids moléculaire 841) et de ses dérivés (AZA-2, $C_{48}H_{73}NO_{12}$, 855 et AZA-3, $C_{46}H_{69}NO_{12}$, 827) correspondant respectivement aux analogues de l'AZA-1 méthylé et déméthylé (substitution d'un hydrogène par un méthyle et inversement (Satake et *al.*, 1998).

Depuis, deux autres analogues de l'AZA ont été isolés, il s'agit des AZA-4 et AZA-5.

La figure 12 donne la structure de base des azaspiracides.

L'origine des azaspiracides n'est pas toujours confirmée. Cependant, ces toxines étant des polyethers, leur origine pourrait être des dinoflagellés comme c'est le cas pour les autres polyethers toxiques (toxines diarrhéiques, pectenotoxine, yessotines...). En effet, le dinoflagellé *Protoperdinium crassipes* pourrait être à l'origine des azaspiracides (James et *al.*, 2003).

Comme les azaspiracides sont des toxines diarrhéiques récemment identifiées, il est difficile d'étudier leur répartition au niveau mondial. Néanmoins, depuis 1996, plusieurs cas d'intoxications liées à cette famille de toxines ont été signalés, non seulement en Irlande mais aussi dans d'autres pays (Norvège, Royaume Uni, Italie, France...) le plus souvent à partir de moules d'origine irlandaise (Ofuji et *al.*, 2001).

C'est pourquoi, au niveau européen, tous les pays membres sont incités à prendre également les azaspiracides lors des contrôles de la salubrité des coquillages.

La dose létale par voie orale chez la souris varie de 250 à 500 μg d'AZA /Kg, selon la variation de réponse individuelle des souris. Il faut noter que la dose de 250 μg est proche de celle obtenue par voie intra péritonéale (200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). De plus, les examens histopathologiques ont montré que les dommages causés par un extrait brut contenant la même dose de toxine sont plus sévères que ceux provoqués par la toxine pure. Ceci est probablement dû à une réaction de synergie avec une autre substance présente dans la matrice de l'extrait brut. Ce phénomène a déjà été observé avec l'acide domoïque (toxine amnésiante).

D'après les données épidémiologiques, la dose d'azaspiracides susceptible de provoquer une intoxication humaine est comprise entre 23 et 86 μg d'AZA. En terme de protection des consommateurs, le seuil de sécurité sanitaire est de 160 μg d'AZA/Kg de chair de coquillage si la méthode de dépistage utilisée est une technique physico-chimique (liée à la disponibilité des standards). Cependant, dans les cas de tests biologique sur souris, c'est le test-souris DSP 24 heures qui est appliqué.

Les azaspiracides provoquent un effet neurotoxique chez la souris suivi d'une mort qui peut être rapide (20-60 min) pour des fortes doses ou lente (2 à 3 jours) pour de faibles doses. Ce grand écart dans la relation dose/effet reste inexplicé puisque le mécanisme d'action est encore mal connu. Par contre, les organes cibles de ces toxines ont été identifiés : il s'agit du tractus digestif, du foie, du thymus, et de la rate (Ito et *al.*, 2000).

Contrairement aux autres phycotoxines, le degré de contamination des moules et des huîtres est équivalent, et le processus de décontamination est long puisqu'il peut atteindre 8 mois. De plus, les azaspiracides s'accumulent également dans la chair. La distribution des différentes toxines dans les coquillages est hétérogène.

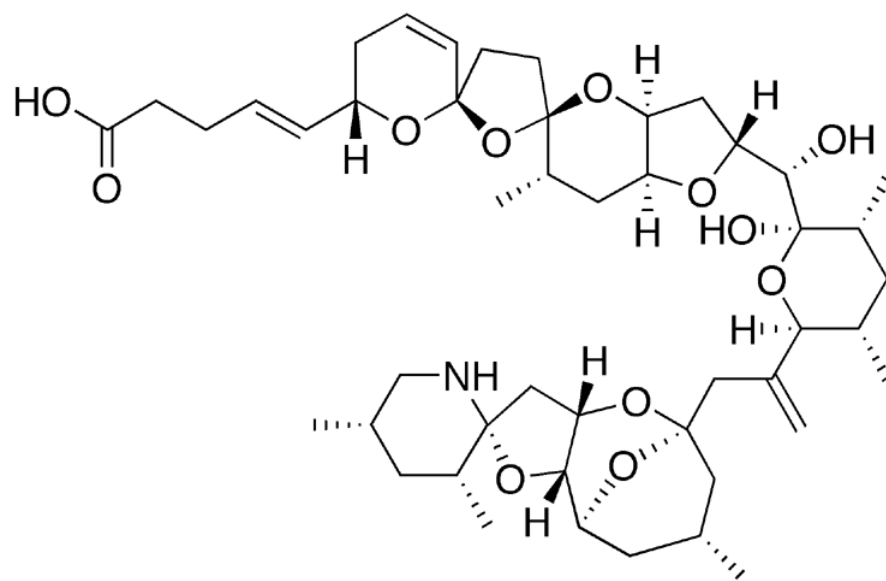


Figure 12 : Structure des azaspiracides.

3. La réglementation

Les règles sanitaires relatives aux phycotoxines, émises dans les textes réglementaires européens, sont en résumé :

- **Pour les toxines PSP :**

- Méthode : analyse biologique, éventuellement associée à une analyse chimique
- Seuil : 80 µg d'équivalent saxitoxine par 100 g de chair de coquillage

- **Pour les toxines ASP :**

- Méthode : chimique par CLHP10 (Chromatographie Liquide Haute Performance)
- Seuil : 20 µg d'acide domoïque par g de chair de coquillage

- **Pour les toxines DSP :**

- Méthode : analyse biologique
- Seuil (pour le test-souris) : mort de 2 souris sur 3 dans les 24 H

La décision de la Communauté Européenne du 15 mars 2002 autorise l'utilisation d'autres méthodes pour les toxines DSP, telles que des méthodes chimiques, s'il est démontré qu'elles sont aussi efficaces que les méthodes biologiques, et que leur application assure un degré équivalent de protection de la santé publique. Des méthodes d'analyse chimique sont en cours de validation à Ifremer et au LNR (Laboratoire National de Référence), pour les toxines DSP.

La mise en œuvre de ces règles sanitaires est précisée par le Laboratoire Communautaire de Référence (Vigo, Espagne) sous forme de recommandations, qui sont relayées, au plan national, par le Laboratoire National de Référence (LNR / AFSSA).

Un groupe de travail LNR / IFREMER a été constitué en 1998, pour une meilleure concertation entre les deux organismes, et pour faire remonter les informations permettant au LNR d'alimenter les réflexions au plan communautaire. Des réunions de ce groupe de travail sont régulièrement organisées depuis cette date (extrait du Cahier des Procédures REPHY, document de prescription interne Ifremer).

4. La situation en France

Les efflorescences algales et le réseau de surveillance en France.

Les efflorescences algales marines sont assez courantes en France, de la fin du printemps au début de l'automne. C'est essentiellement pendant cette période, que la presse, publie des avis des autorités sanitaires liés à ce problème.

Depuis 1984, un système de surveillance permanent assuré par l'IFREMER a été mis en place en France pour détecter les efflorescences de phytoplancton toxique et vérifier la salubrité des coquillages afin d'interdire la pêche et la commercialisation des coquillages incriminés.

Ce réseau est chargé principalement de :

- La protection de la santé publique : détection et suivi des espèces toxiques pour l'homme via les coquillages.
- La collecte des données sur les organismes phytoplanctoniques afin d'étudier l'évolution des différentes espèces.
- La protection de la faune marine : détection et suivi des espèces nuisibles pour les animaux marins.

Le réseau REPHY (réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines) comprend 43 sites (divisés en 119 bassins) de prélèvements répartis sur le littoral français. Il assure une surveillance permanente et un dénombrement des espèces phytoplanctoniques sur l'ensemble des côtes françaises. Les prélèvements, dans les secteurs concernés par les efflorescences, sont effectués deux fois par mois de septembre à avril et une fois par semaine de mai à août, période favorable à la prolifération du phytoplancton.

Quatre principaux genres d'algues unicellulaires (*Dinophysis*, *Gyrodinium*, *Alexandrium*, *Phaeocystis*) font l'objet d'une surveillance systématique en France. Les nuisances que provoquent ces différentes espèces de dinoflagellés diffèrent selon les cas, certaines sont toxiques pour l'homme, d'autres seulement nuisibles.

En cas d'efflorescences de dinoflagellés, l'alerte peut être donnée soit à partir des résultats d'analyses soit à partir des informations extérieures (pêcheurs, conchyliculteurs, Direction Départementale des affaires Sanitaires et Sociales "DDASS").

L'alerte est immédiatement suivie, grâce à une liaison informatique, d'une multiplication des lieux de contrôle (197 points mobilisables au total) avec des prélèvements deux fois par semaine dans les secteurs touchés par les dinoflagellés.

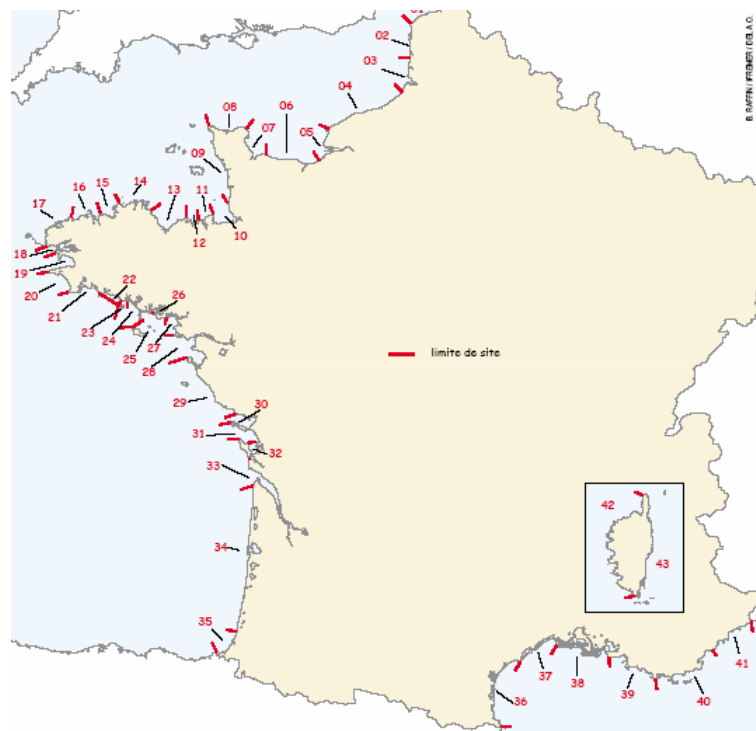
Les prélèvements sont constitués d'échantillons de coquillages pour subir des tests de toxicité de type DSP ou PSP et de prélèvements d'échantillons d'eau pour un dénombrement des espèces phytoplanctoniques.

Le résultat des dénombrements de dinoflagellés toxiques est mis à la disposition permanente, par minitel, des administrations et des comités interprofessionnels.

Lorsque la concentration dépasse le seuil de 200 cellules par litre, des tests de toxicité aigue sur souris sont pratiqués.

Si le test souris est positif (mort d'au moins deux souris sur trois) IFREMER informe l'administration départementale des affaires maritimes qui prend, par délégation du préfet, la décision d'interdiction de pêche et de commercialisation des coquillages.

Les DDASS sont chargées de la communication à l'IFREMER de tous les cas d'intoxication provoqués par les DSP ou les PSP afin de renforcer les contrôles.



**Figure 13 : Points de prélèvements en France.
(Document de prescription interne IFREMER, 2003)**

TROISIEME PARTIE :

**LES METHODES DE DETECTION DES TOXINES
DIARRHEIQUES DANS LES COQUILLAGES**

1. Les méthodes reposant sur la toxicité de l'acide okadaïque

1.1. Bioessais sur animaux

1.1.1. Sur rongeurs

Critère de positivité : Action létale

Ces tests donnent une réponse de type "positif / négatif", la positivité correspondant à la mort des animaux. Le premier test mis au point, qui reste encore le plus utilisé et est recommandé par le LNR, est celui de Yasumoto (1978).

20 g d'hépatopancréas sont prélevés et homogénéisés avec 50 ml d'acétone. Le mélange est ensuite filtré. Le résidu est repris avec 50 ml d'acétone et à nouveau filtré. L'opération est répétée une troisième fois. Les extraits sont réunis et évaporés à sec, puis repris dans 4 ml de Tween 60 à 1%. Cette solution est injectée par voie intra péritonéale, à raison de 1 ml par animal, à 3 souris mâles Swiss de 20 g. le test est considéré positif si deux des trois souris meurent dans un délai de 24 heures.

La quantité de toxines nécessaire pour tuer une souris de 20 g dans en 24 heures est définie comme étant une unité souris (US). Ceci correspond approximativement à 4 µg d'acide okadaïque (Lee et *al.*, 1987). 1ml de la solution injectée aux souris représentant l'extraction de 5 g d'hépatopancréas, il a été estimé que le seuil de positivité de la méthode était de 0.8 µg équivalent AO/g d'hépatopancréas. La glande digestive constituant entre 10 et 20% de la chair totale du coquillage, ce seuil correspond à une contamination de 80 à 160 µg équivalent AO/kg de chair totale (Fernandez, 1996).

Pour accroître la spécificité du test, certaines adaptations ont par la suite été apportées. Elles portent essentiellement sur le mode d'extraction et de purification des extraits pour réduire le risque de positivité due à des substances autres que les toxines diarrhéiques (composés matriciels ou autres toxines).

Hamano et *al.*, (1985) reprennent le résidu sec avec de l'éther de diéthyne et réalisent une partition liquide/liquide avec de l'eau afin d'éliminer les interférents hydrosolubles. Après reprise dans du méthanol aqueux (80%), Stabell et *al.*, (1991) réalisent une partition avec de l'éther de pétrole, puis entre la phase aqueuse (ajustée à 60% de méthanol) et du chloroforme. Marcaillou-Lebaut et *al.* (1990) remplacent l'acétone par du méthanol aqueux (80%), puis réalisent des partitions avec de l'hexane et du chloroforme, à l'instar de ce qui est fait pour l'analyse en CLHP dans le protocole de Lee et *al.* (1987).

D'autres auteurs ont proposé que le seuil de positivité soit relevé en réduisant le temps d'observation des souris à 5 heures (Marcaillou-Lebaut et *al.* 1985). Par ailleurs, les mêmes auteurs utilisent pour exprimer leurs résultats le temps moyen de survie des animaux, qu'ils comparent à ce seuil de 5 heures.

Critère de positivité : Action diarrhéique

Le phénomène diarrhéique observé chez le consommateur humain, lié à une accumulation de fluide dans l'intestin, se produit également chez les animaux après administration orale ou injection directe dans une portion du tube digestif.

Le test sur souriceaux non sevrés (suckling mice assay) consiste en une administration intra-gastrique d'extraits de fruits de mer. Après 4 heures, les animaux sont sacrifiés. Le test est considéré comme positif (contamination présentant un risque pour le consommateur) si le rapport entre le poids du tube digestif (comprise entre le duodénum et le rectum) et le reste du corps est supérieur à 0.09. Le seuil de positivité est 0.1 US (Hamano et *al.*, 1985).

Le test sur anses intestinales de lapin ou de souris (intestinal loop assay) est de principe équivalent : les extraits de fruits de mer en solution dans du tween 60 1% sont injectés dans des anses intestinales d'animaux anesthésiés. Après 18 heures pour le lapin et 6 heures pour la souris, le rapport entre le volume (en ml) du liquide accumulé dans l'anse et la longueur de l'anse (en cm) est calculé. Le test est positif si ce rapport est supérieur à 1 pour le test sur lapin, et à 0.1 pour le test sur souris. Les seuils de positivité sont de 4 US pour le lapin et 0.4 US pour la souris (Hamano et *al.*, 1985).

Le test sur rat consiste à présenter à des animaux préalablement privés de nourriture une alimentation à laquelle sont mélangées des parties de fruits de mer à tester. L'observation des rats dure 16 heures. Elle porte sur l'apparition de signes de diarrhée (consistance et importance des fèces) et sur le refus de la nourriture. Les performances de ce test, qui est utilisé dans le cadre officiel aux Pays-Bas, sont très difficiles à évaluer.

1.1.2. Sur invertébrés

Un test sur protozoaire *Tetrahymena pyriformis* a été développé par Shiraki : la quantification des toxines diarrhéiques, exprimée en US, est déterminée par la mesure de la concentration inhibitrice 50% de l'activité phosphatase acide et par l'inhibition de la croissance de ces organismes (Shiraki et *al.*, 1985).

Vernoux et *al.* (1993) ont étudié l'activité de l'acide okadaïque sur des cultures de *Daphnia magna*, crustacé du zooplancton. Le critère de toxicité retenu est l'inhibition de la mobilité. La concentration efficace 50% (CE 50%) est de 20 nM d'acide okadaïque. Une étude sur larves de diptères (*Parasarcophaga argyostoma*) a montré l'activité de diverses substances toxiques dont l'acide okadaïque sur la mobilité et la mort de ces organismes. Ce test d'une grande simplicité de réalisation permettrait une évaluation semi-quantitative de la présence de toxines (Labrousse & Matile, 1996).

1.2. Cultures cellulaires

Les critères retenus pour ce test sont de deux natures : des modifications morphologiques ou la viabilité.

1.2.1. Modifications morphologiques

Comme nous l'avons précédemment indiqué, les cellules de type fibroblastique manifestent des signes de toxicité précoce à des doses sublétales, se traduisant principalement par la perte de leur forme fusiforme et un arrondissement.

Hamano et *al.* (1985) comparent les effets des différentes toxines du groupe DSP et notent que des altérations morphologiques atteignent respectivement 28 et 75% des cellules après 24 heures d'exposition à 0.06 et 0.6 μM d'acide okadaïque, alors que pour les mêmes doses, les DTX-1 et 3 ont des effets comparables après seulement 4 heures d'exposition.

Des hépatocytes de rat fraîchement préparés montrent, après 2 heures d'exposition à 0.6 μM d'acide okadaïque la formation de *tiny blebs* sur la surface cellulaire sans que la viabilité, mesurée par le relargage de lactate déshydrogénase (LDH), ne soit altérée (Aune et *al.*, 1991).

Fladmark et *al.* (1998) rattachent ces événements à un phénotype apoptotique et notent que les hépatocytes de saumon sont 10 à 20 fois plus sensibles à l'acide okadaïque (CE_{50} , 2h = 20 nM) que les hépatocytes de rat. Il indique que l'inhibition d'agrégation des hépatocytes est un paramètre de détection plus précoce que les modifications morphologiques (CE_{50} , 2h = 2 nM).

Amzil et *al.* (1992) ont mis au point un test de détection des toxines diarrhéiques sur cellules KB, le DRAME (Détection Rapide de l'Acide Okadaïque dans les moules Après Extraction). Le test possède deux originalités (i) la lecture des résultats se fait en microscopie optique directe sans coloration préalable par comparaison des cultures

traitées et des cultures témoins, en recherchant la présence des cellules transformées, (ii) le mode d'évaluation est basé sur la recherche de la concentration minimale active (CMA), qui est la concentration minimale en extrait testé nécessaire pour entraîner une modification visible de l'aspect de la culture cellulaire traitée.

1.2.2. Viabilité

Les tests de viabilité reposent sur l'aptitude des cellules à intégrer, exclure ou transformer un colorant. Ce principe permet d'obtenir une coloration spécifique, d'intensité quantifiable, proportionnelle à la viabilité des cellules.

Aune et *al.* (1991) ne notent aucune diminution de viabilité des hépatocytes de rat pendant les 2 heures d'exposition d'acide okadaïque grâce au bleu de trypan.

Fressard et *al.* (1994) évaluent la concentration inhibitrice 50 (3 heures) sur BHK21 C13 à 22nM en utilisant l'incorporation du rouge neutre. Un test quantitatif pour la contamination des fruits de mer a été mis au point sur cellules KB par transformation du bromure de 3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyl tetrazolium (MTT) en un composé formazan bleu : la concentration inhibitrice 50% à 24 heures étant de 8 nM, ce test permet de détecter des contaminations de 50 ng/g de glandes digestives (Tubaro et *al.*, 1996).

Avec le même colorant, Blay & Poon (1995) déterminent des CE50 comprises entre 5 et 40 nM sur des lignées intestinales non transformées (RIE-1 et IEC-6) et cancéreuses (HT-29, T84 et MCA-38). Après 48 heures d'observation par ce protocole, ils détectent des concentrations de 0.4 µg d'AO/g de chair de mollusques.

2. Les méthodes physico-chimiques

2.1. Méthodes chromatographiques

Les techniques de chromatographie sont très largement utilisées dès lors qu'il s'agit d'isoler un composé que ce soit pour son identification ou sa détection. La première méthode de chromatographie liquide haute performance (HPLC) qui a été mise au point pour la recherche de l'acide okadaïque est celle proposée par Lee et *al.* (1987). Elle reste aujourd'hui encore la plus utilisée.

Le principe de cette technique est une extraction de l'acide okadaïque à partir des matrices susceptibles de contenir des toxines diarrhéiques (glandes digestives de coquillages bivalves, cultures de dinoflagellés) par du méthanol aqueux (80%). Cet extrait est ensuite lavé à l'éther de pétrole (pour éliminer les composés les plus apolaires) puis extrait par du chloroforme (pour ne pas conserver les composés les plus polaires). La toxine n'ayant aucune propriété de fluorescence et un spectre UV aspécifique, une étape intermédiaire de dérivatisation avec un composé fluorophore, le 9-anthryl-diazo-méthane (ADAM) est nécessaire pour la détection. Après purification sur cartouche de silice, l'échantillon est injecté dans un système CLHP en conditions isocratiques avec détection fluorimétrique (Longueur d'onde d'excitation = 365 nm, longueur d'onde d'émission = 412 nm). Les DTX-1 et 2 sont détectables par cette méthode. La limite de détection est de l'ordre de 0.4 µg d'AO/g de glande digestive (Lee et *al.*, 1987).

La quasi totalité des méthodes chromatographiques qui ont été proposées depuis vise à modifier ou à optimiser une ou plusieurs des étapes de ce protocole.

Les solvants

Diverses modifications de la nature des solvants ont été proposées afin d'obtenir des rendements d'extraction plus importants et une élimination améliorée des interférants matriciels. Concernant l'extraction, le méthanol aqueux a été remplacé par de l'isopropanol. De même, des travaux ont démontré que le chloroforme pouvait être remplacé par du dichlorométhane ou de l'acétate d'éthyle. Ce dernier, permet de supprimer les risques liés à la grande nocivité des dérivés chlorés pour les manipulateurs et pour l'environnement.

Autres types de modifications

L'utilisation de la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide a été d'une grande utilité pour l'identification de nouveaux dérivés (DTX-2B, 2C, diols-esters) et pour confirmer sans ambiguïté la présence de composés connus (James et *al.*, 1997). Toutefois, cette technique lourde, coûteuse et nécessitant un personnel expérimenté, ne peut être mise en œuvre que dans un nombre réduit de laboratoires. La technique la plus employée est le couplage chromatographie liquide / spectrométrie de masse à pression atmosphérique avec une ionisation de type électrospray. Enfin, récemment, une technique de purification par chromatographie d'exclusion de taille (perméation sur gel) avant analyse par LC/MS a été présentée (Hummert et *al.*, 2000).

2.2. Electrophorèse capillaire

Boland et *al.* (1993) proposent une technique très performante de couplage de l'électrophorèse capillaire, avec détection UV, par une séparation en chromatographie liquide et un test d'inhibition des protéines phosphatases leur permettant d'abaisser le seuil de détection à 100 pg d'acide okadaïque injectés.

Une technique de chromatographie électrocinétique micellaire, l'une des variantes de l'électrophorèse capillaire faisant intervenir des interactions hydrophobes entre la toxine et des micelles de dodécyle sulfate de sodium, a permis d'abaisser le seuil à 40 pg et de détecter des concentrations équivalentes à 10 ng/g de chair de coquillages (Puech, 2000).

3. Les méthodes immunologiques

Ces techniques font intervenir les réactions hautement spécifiques de type antigène-anticorps.

Levine et *al.* (1988) proposent un radioimmunoessai (RIA) faisant intervenir des anticorps de lapin et de l'acide okadaïque tritié. Le test repose sur l'inhibition compétitive de la fixation d'acide okadaïque radioactif par les molécules naturelles présentes dans des matrices contaminées. La quantification est réalisée par mesure de la radioactivité fixée sur les anticorps. La quantité d'acide okadaïque détectable est de l'ordre de 0.2 pmol (environ 0.2 ng).

Un test ELISA a par la suite été développé à l'aide d'un anticorps monoclonal : l'acide okadaïque est fixé dans des micropuits et les anticorps monoclonaux sont marqués par de la peroxydase pour une détection colorimétrique. La quantification est réalisée par la mesure de l'inhibition de la fixation de l'anticorps sur l'acide okadaïque présent dans la matrice contaminée. La limite de détection est de l'ordre de 0.10 µg/ml, soit 0.12 µM (Usagawa et *al.*, 1989).

Shestowsky et *al.* (1992) utilisent le même principe mais remplacent l'acide okadaïque fixé, d'un coût élevé, par un anticorps anti-idiotypique (ayant la même structure épitope que l'acide okadaïque). La quantification est comprise dans une gamme allant de 10-100 μM .

Un test dérivé de la méthode ELISA, le S-PIA (Solid-Phase Immunosorbent Assay) fait intervenir un anticorps fixé sur une bandelette directement mise en contact avec les échantillons suspects. La limite de détection est de 50 pg d'acide okadaïque. Ce test permet également de détecter la ciguatoxine.

4. Les méthodes biochimiques

Ces méthodes reposent sur la propriété de l'acide okadaïque d'inhiber des protéines phosphatases, principalement de type 2A (PP2A). La détection et la quantification de la toxine se font à partir de l'activité résiduelle de l'enzyme, c'est-à-dire de la fraction en excès, non inhibée. Cette activité est mesurée par la transformation d'un substrat en un produit dont les propriétés colorimétriques, fluométriques ou radioactives sont différentes.

Un test associant la chromatographie liquide et l'inhibition spécifique des PP1 et PP2A de muscle squelettique de lapin a été tout d'abord proposé : il repose sur la déphosphorylation d'une protéine marquée par du phosphore radioactif, la phosphorylase a (Luu et *al.*, 1993). La limite de détection est de l'ordre de 1 pg par essai, soit environ 10 ng/g de glande digestive.

Simon & Vernoux (1994) ont développé un test colorimétrique en utilisant une préparation de protéines phosphatases semi-purifiées extraites de muscle de lapin : le substrat des enzymes, le phosphate de paranitrophényle incolore, est transformé en paranitrophénol jaune. La limite de détection est de 100 ng/g de chair. Ce test a été par la suite optimisé avec une protéine phosphatase 2A à partir d'érythrocytes humains, disponibles dans le commerce. La limite de détection est de 2 ng/g d'hépatopancréas (Tubaro et *al.*, 1996).

Pour accroître la sensibilité, Vieytes et *al.* (1997) emploient une détection fluorimétrique : ils obtiennent avec le phosphate de 4-méthylumbelliféryle et le diphosphate de fluorescéine une limite de détection de 12.8 ng/g de glande digestive. La comparaison des méthodes colorimétriques et fluorimétriques montre que les secondes ont une meilleure reproductibilité et que leurs résultats sont généralement en accord avec ceux obtenus par les bioessais sur souris, la spectrométrie de masse et les méthodes ELISA (Puech, 2000).

Récemment, un test d'inhibition compétitive avec la microcystine marquée (toxine de cyanobactéries ayant également des propriétés d'inhibiteur de protéines phosphatases) a été publié (Serres et *al.*, 2000). Ce test dont la limite de détection est de 10 fmol d'acide okadaïque aurait une robustesse accrue (moindre sensibilité aux interférants).

**DEVELOPPEMENT D'UN TEST DE
DETECTION DES TOXINES :
PARTIE EXPERIMENTALE**

1. Introduction

En dépit de la multiplicité et de la variété de nature des méthodes présentées dans la partie précédente, nous pouvons noter qu'à l'heure actuelle aucune n'a pu être validée de façon officielle pour remplacer le test souris afin de détecter les toxines. Plusieurs raisons peuvent être avancées pour expliquer ce fait :

- Les fruits de mer, comme la majorité des matrices alimentaires, sont complexes et contiennent de très nombreuses molécules dont certaines ont des comportements proches de celles des toxines recherchées pendant les étapes d'extraction et de purification. Ces interférences gênent la détection et la quantification des toxines diarrhéiques et génèrent des résultats faussement positifs, préjudiciables aux acteurs économiques de la filière de production, ou faussement négatifs dont les conséquences peuvent être graves pour la santé publique. Très variables en quantité et en qualité selon les espèces, la zone de production, la saison ou l'état physiologique des fruits de mer, ces interférences sont à l'origine de mauvaises performances de reproductibilité intra ou inter-laboratoire.

- Les propriétés physico-chimiques de l'acide okadaïque et de certaines DTXs sont très distinctes.

En se basant sur les travaux effectués par Simon et Vernoux (1991), nous avons étudié la possibilité de développer un test colorimétrique simple de détection de l'acide okadaïque, basé sur l'activité enzymatique des protéines phosphatases.

Dans les cellules, les protéines kinases ont pour rôle de fixer un groupement phosphate sur certaines protéines et ainsi provoquer leur activation. Les protéines phosphatases à l'inverse vont retirer le groupement phosphate et donc entraîner l'inactivation de cette protéine (figure 9).

Cette activité peut être mise en évidence par la réaction du paranitrophényl phosphate (PNPP) incolore qui est transformé par les protéines phosphatases en paranitrophénol (PNP) de couleur jaune.

L'acide okadaïque qui inhibe les protéines phosphatases, bloque cette réaction, qui se traduira par une diminution de la coloration induite.

Une lecture au spectrophotomètre (à 405 nm), permettra d'évaluer, la quantité d'acide okadaïque présente dans l'échantillon dosé, en comparant avec des témoins n'en contenant pas.

Dans un premier temps nous avons étudié la possibilité d'utiliser les cultures de cellules KB comme source de protéines phosphatases. Nous avons ensuite recherché d'autres matrices biologiques pour simplifier l'approvisionnement en enzymes.

2. Utilisations des cellules KB comme source enzymatique

2.1. Les cellules KB

2.1.1. Origine

La lignée KB (référence ATLC CCL17) dérive d'un carcinome épidermique de rhinopharynx prélevé par le Professeur Eagle, chez un adulte en 1954, dont les initiales étaient KB.

Ce fut une des premières lignées cellulaires humaines utilisée pour des études de cytotoxicité générale, ainsi que pour des études sur la nutrition et le métabolisme cellulaire, les phénomènes de tumorigénicité et le dépistage de substances anti-tumorales.

2.1.2. Entretien des cellules

Les cellules KB sont des cellules relativement résistantes, qui ne se modifient pas génétiquement au cours du temps.

Elles sont cultivées *in vitro* à 37°C dans des flasques en plastique et sont repiquées toutes les 48 heures.

Ces cellules vivent dans un milieu appelé le Basal Medium Eagle (BME) qui est un milieu nutritif complété par des antibiotiques (pénicillines, streptomycine) pour prévenir une éventuelle contamination du milieu, et des facteurs de croissance (Sérum de veau fœtal SVF, glutamine).

Après 48 heures d'incubation, la flasque, contenant dans le fond la monocouche de cellules, est rincée avec un tampon : le Phosphate Buffered Saline (PBS).

La trypsine (5ml) est laissée en contact pendant une minute sur la monocouche de cellules puis la flasque est incubée quelques minutes à 37°C pour permettre à l'enzyme de rompre les liaisons entre les cellules.

Par aspiration et refoulement successifs avec du BME, les cellules sont mises en suspension. Le volume est équitablement réparti entre deux flasques. Chacune des deux flasques est complétée avec le milieu nutritif puis sont incubées à 37°C sous une atmosphère enrichie à 5% de CO₂

2.1.3. Obtention du lysat

Le test qui est mis en place utilise les enzymes contenues dans les cellules KB, notamment les protéines phosphatases. Ces dernières permettent la transformation du PNPP en PNP et la libération d'un groupement phosphate. De plus, ces enzymes sont inhibées par l'acide okadaïque.

Pour obtenir ces enzymes il est donc nécessaire de lyser les cellules avec un tampon de lyse : le CELLYTIC®-M mammalian cell lysis/Extraction Reagent.

Des études antérieures ont montré que pour obtenir une coloration jaune avec du PNPP, qui absorbe dans une fenêtre de 0,9 à 1,4 au spectrophotomètre, il est nécessaire de travailler sur une suspension cellulaire de 400 000 cellules par millilitre. Ce calcul s'effectue grâce à une lame de Malassez.

Les cellules contenues dans le fond de la flasque sont rincées, trypsinées. Le surnageant est vidé puis un volume connu est introduit dans la flasque de culture. Par aspiration et refoulement successifs, les cellules sont mises en suspension.

A l'aide d'une pipette, quelques microlitres de cette suspension sont déposés entre la surface de la lame de Malassez et la lamelle.

Par capillarité la suspension cellulaire s'étale sur la totalité de la lame de Malassez. Le dénombrement s'effectue ensuite avec un microscope au grossissement fois 10. Seules sont comptabilisées les cellules viables contenues dans chaque zone définie par un carré représentant au total 1 ml.

Pour plus de représentativité, le calcul s'effectue sur une dizaine de mesures en prenant des zones aléatoires.

Après avoir obtenu la suspension cellulaire par dilution, il est important de rincer les cellules avec du tampon PBS, afin d'éliminer tous les éléments indésirables (fragments de cellules, cellules non viables...), puis d'ajouter quelques microlitres de tampon de lyse (CELLYTIC®-M mammalian cell lysis/Extraction Reagent). Ce dernier est laissé en contact pendant 15 minutes à température ambiante et sous agitation.

Au bout des 15 minutes, nous obtenons le lysat avec les enzymes dont les protéines phosphatases dans le fond du tube.

2.2. Le Para Nitro Phényl Phosphate (PNPP)

Le PNPP (Para Nitro Phényl Phosphate) est un substrat incolore qui est transformé par les protéines phosphatases en ParaNitroPhénol (PNP) de couleur jaune qui absorbe à 405 nm.

De nombreux travaux ont montré que les protéines phosphatases de type 1 et 2A sont inhibées par l'acide okadaïque. De plus, il a été démontré que ces enzymes permettaient la transformation du PNPP en PNP. Ainsi, si l'acide okadaïque et le PNPP sont présents dans une solution contenant des protéines phosphatases, alors l'acide okadaïque va bloquer la transformation du PNPP en PNP par les protéines phosphatases, d'où une diminution de l'intensité de la coloration de la solution.

Le PNPP se trouve sous forme de petit comprimé, conservé au congélateur à -24°C dans un emballage le protégeant de la lumière. Le PNPP se dissout dans une solution tampon préparée extemporanément. Ce tampon est fourni par le laboratoire sous forme de comprimé et dissout dans de l'eau distillée. Le comprimé de PNPP est à son tour dissout dans cette solution tampon. Après dissolution complète le PNPP est stable environ une heure (données fabricant).

2.3. Les différentes dilutions de l'acide okadaïque

L'acide okadaïque, disponible au laboratoire, se trouve conservé à -24°C dans des tubes à hémolyse en verre. Chaque tube contient une masse sèche de 2 µg d'acide okadaïque pur (Calbiochem, AA8227800).

Le tube est sorti quelques minutes avant de l'utiliser pour que l'acide okadaïque soit à température ambiante.

Différents travaux ont montré que cette toxine n'est soluble que dans certains solvants comme le méthanol, l'éthanol, le DMSO, le DMF. Cependant l'éthanol, le DMSO et le DMF sont toxiques pour les cellules. Pour la préparation des dilutions de l'acide okadaïque, nous utilisons le méthanol. Ce dernier, pour ne pas dénaturer les enzymes, ne doit être dans une proportion supérieure à 40% dans le milieu final.

Pour cela, l'acide okadaïque contenu dans le fond du tube à hémolyse est repris avec 1ml d'un mélange méthanol / eau (40/60). La concentration de la solution est alors de 2 µg/ml (solution 1).

En fonction du nombre de puits à préparer le volume de la solution 1 à prélever varie, mais pour l'essentiel du travail, les mesures pour chaque concentration en acide okadaïque sont faites sur six puits contenant chacun 50 µl de la solution 1 soit un total de 300 µl.

Ce volume sert ensuite à préparer la solution 2 qui a une concentration de 1 µg/ml (dilution au demi par du PBS).

La solution 1 peut de nouveau être conservée à -24 °C quelques jours.

2.4. Résultats et discussions

2.4.1. Mise en évidence de l'activité enzymatique

L'activité phosphatasique est mise en évidence par l'intermédiaire d'une réaction colorée avec le PNPP. En effet, lorsque le lysat cellulaire des cellules KB est en présence de PNPP, il se forme du PNP et un groupement phosphate. Le PNP qui se forme est de couleur jaune vif caractéristique. L'intensité du jaune est proportionnelle à la quantité de PNP formée.

Il a été montré au paragraphe précédent que ce sont les protéines phosphatases qui permettent la déphosphorylation d'un substrat avec production d'un groupement phosphate libre. Le lysat cellulaire de cellules KB contient donc de telles protéines.

Dans chaque cupule sont déposés (i) 150 μ l de PNPP (ii) 50 μ l de lysat.

Les plaques 96 puits sont incubées à l'obscurité dans une étuve à 37°C pendant 30 minutes. Après l'incubation la plaque obtenue est reproduite sur la figure 14 :

2.4.2. Mise en évidence de l'inhibition enzymatique par diminution de la coloration

2.4.2.1. Objectif

La première étape est de démontrer la diminution de l'absorbance de la solution à 405 nm en présence d'acide okadaïque.

2.4.2.2. Protocoles

Une plaque 96 puits est préparée : chaque puit contenant (i) 150 µl de PNPP, (ii) 50 µl d'une dilution d'acide okadaïque et (iii) 50 µl de lysat cellulaire.

Le sens d'introduction des réactifs étant respectivement le substrat puis l'acide et enfin le lysat.

La gamme des concentrations testées va de 0,2 µg/ml à 6,25 ng/ml d'acide okadaïque par puit. Pour plus de représentativité chaque concentration est reproduite sur 6 puits.

La plaque contient deux séries de puits témoin composés de (i) 150 µl de PNPP, (ii) 50µl de lysat. Les 50 µl de la solution d'acide okadaïque sont remplacés par 50 µl de PBS. D'autre part sur chaque essai, sont réalisées deux séries de blanc avec le PNPP et le PBS ; l'acide okadaïque n'absorbant pas à 405 nm.

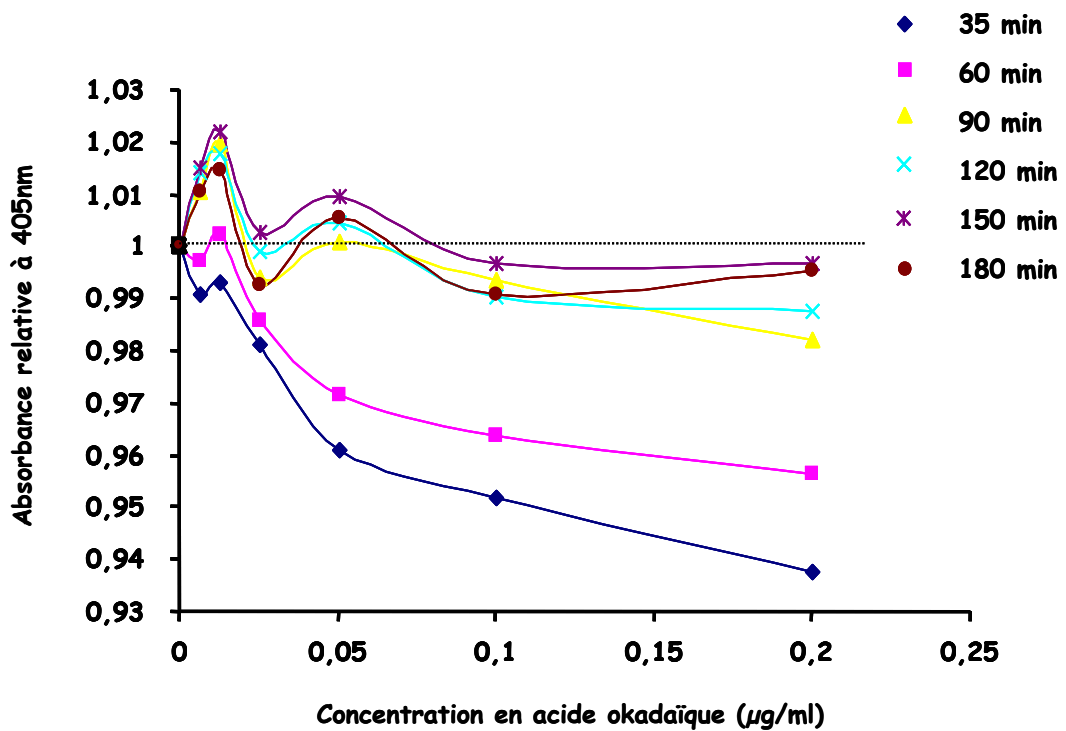
La plaque est ensuite incubée à 37 °C pour que la réaction enzymatique se fasse. Les mesures sont effectuées 30 minutes après le début de l'incubation et ce toutes les 30 minutes pendant 3 heures.

2.4.2.3. Résultats

Les valeurs moyennes sont représentées dans le tableau 3.

**Tableau 3 : Absorbances moyennes à 405 nm (\pm s.e.m.)
après addition d'acide okadaïque sur du lysat de cellules KB.**

AO ($\mu\text{g/ml}$)	35 min		60 min		90 min		120 min		150 min		180 min	
	moyenne	esm	moyenne	esm	moyenne	esm	moyenne	esm	moyenne	esm	moyenne	esm
0	0,421	0,005	0,597	0,005	0,776	0,008	0,958	0,009	1,134	0,011	1,319	0,014
0,015	0,417	0,005	0,596	0,008	0,784	0,012	0,972	0,016	1,151	0,019	1,333	0,022
0,03125	0,418	0,004	0,599	0,006	0,791	0,006	0,975	0,009	1,159	0,010	1,338	0,012
0,0625	0,413	0,010	0,589	0,012	0,771	0,009	0,958	0,012	1,137	0,013	1,309	0,015
0,125	0,405	0,005	0,580	0,009	0,777	0,014	0,963	0,020	1,145	0,024	1,326	0,030
0,25	0,401	0,008	0,576	0,013	0,771	0,020	0,949	0,027	1,130	0,034	1,307	0,040
0,5	0,395	0,008	0,571	0,017	0,762	0,025	0,946	0,032	1,130	0,041	1,313	0,049



Graph 1 : Inhibition de l'activité phosphatase du lysat de cellules KB sur le PNPP : évolution de l'absorbance à 405 nm par rapport au témoin en fonction de la concentration en acide okadaïque et du temps.

D'après le graphe 1, qui représente l'absorbance relative en fonction de la concentration en acide okadaïque (données, tableau 3), une diminution de l'absorbance est observée notamment au temps 35 et 60 minutes.

Au delà de 60 minutes une augmentation de l'absorbance est constatée aux faibles concentrations en acide (0,00625 et 0,0125 µg/ml) et pour les plus fortes concentrations c'est un effet de plateau qui apparaît. Ceci peut être expliqué par la stabilité du PNPP qui selon les données du fournisseur n'est que de 60 minutes.

Au vu de ces résultats, il est nécessaire de déterminer le temps optimal d'incubation.

2.4.3. Détermination du temps optimal d'incubation.

2.4.3.1. Protocoles

Afin de déterminer le temps idéal d'incubation, l'expérience précédente est de nouveau pratiquée avec une gamme de concentration en acide okadaïque s'échelonnant de 0.2 µg/ml à 0.0125 µg/ml. La plaque est incubée à 37 °C dans l'obscurité.

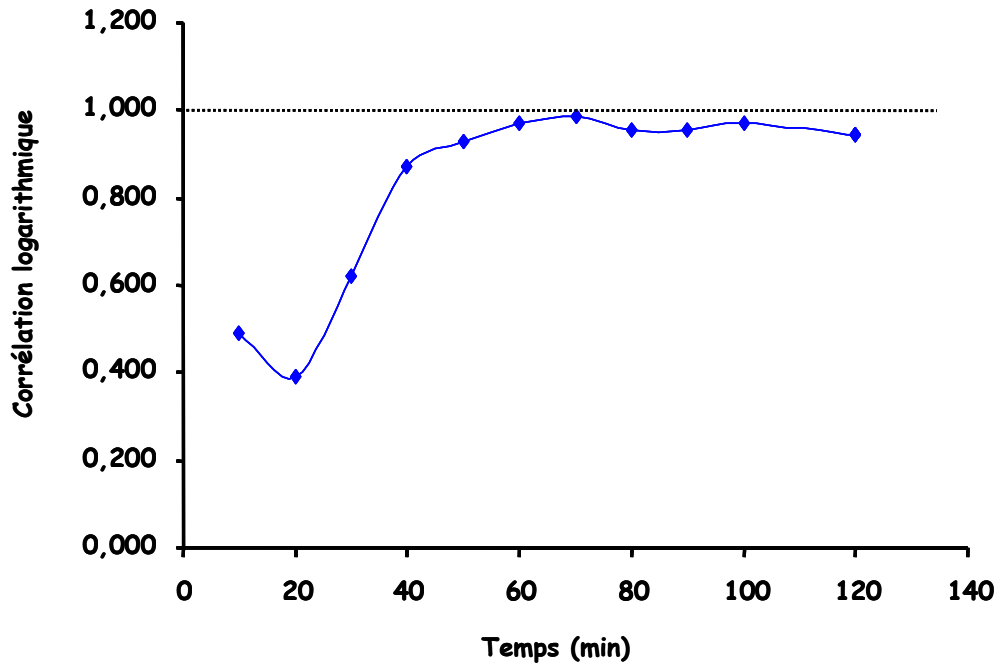
2.4.3.2. Résultats

Les mesures d'absorbance à 405 nm sont faites au spectrophotomètre toutes les 10 minutes pendant 120 minutes. Les valeurs moyennes sont données dans le tableau 4. Ensuite, pour évaluer le temps d'incubation optimal, le coefficient de corrélation entre le logarithme de l'absorbance et la concentration en acide okadaïque est calculé pour chaque temps.

L'évolution de la corrélation entre le logarithme de l'absorbance et la concentration en acide okadaïque en fonction du temps est représentée sur le graphe 2.

Tableau 4 : Absorbance moyenne en fonction du temps et de la concentration en acide okadaïque ± e.s.m.

AO ($\mu\text{g/ml}$)		0	0,0125	0,025	0,05	0,1	0,2
10 min	moyenne	0,208	0,223	0,221	0,217	0,216	0,219
	esm	0,037	0,002	0,002	0,001	0,001	0,002
20 min	moyenne	0,325	0,277	0,275	0,271	0,267	0,273
	esm	0,002	0,002	0,002	0,001	0,002	0,005
30 min	moyenne	0,419	0,343	0,337	0,332	0,327	0,331
	esm	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,007
40 min	moyenne	0,518	0,418	0,411	0,404	0,396	0,394
	esm	0,003	0,002	0,003	0,003	0,003	0,009
50 min	moyenne	0,602	0,482	0,476	0,469	0,463	0,457
	esm	0,004	0,001	0,004	0,004	0,004	0,009
60 min	moyenne	0,707	0,563	0,557	0,552	0,546	0,536
	esm	0,006	0,003	0,006	0,007	0,006	0,009
70 min	moyenne	0,796	0,629	0,624	0,618	0,610	0,598
	esm	0,005	0,002	0,006	0,007	0,006	0,008
80 min	moyenne	0,867	0,678	0,672	0,666	0,653	0,646
	esm	0,004	0,002	0,005	0,007	0,005	0,013
90 min	moyenne	0,943	0,733	0,729	0,724	0,708	0,702
	esm	0,004	0,003	0,005	0,008	0,005	0,014
100 min	moyenne	1,028	0,798	0,793	0,788	0,770	0,760
	esm	0,005	0,003	0,005	0,010	0,006	0,015
110 min	moyenne	1,140	0,900	0,898	0,900	0,888	0,908
	esm	0,011	0,007	0,011	0,013	0,014	0,014
120 min	moyenne	1,168	0,910	0,909	0,906	0,886	0,880
	esm	0,011	0,004	0,006	0,011	0,007	0,015



Graph 2 : Coefficient de corrélation entre le logarithme de l'absorbance et la concentration en acide okadaïque en fonction du temps.

D'après le graphe 2, représentant le Coefficient de corrélation entre le logarithme de l'absorbance et la concentration en acide okadaïque en fonction du temps, la durée optimale d'incubation à 37°C du PNPP avec le lysat de cellules KB en présence d'acide okadaïque est comprise entre 60 et 80 minutes avec un optimum à 70 minutes.

2.4.4. Détermination du volume optimal de substrat

2.4.4.1. Protocoles

Le volume total contenu dans le puit semble influencer la réaction enzymatique. Les volumes de l'acide okadaïque et du lysat sont fixes. Seul le volume de PNPP va varier.

La préparation de la plaque diffère des autres expériences dans la mesure où la concentration en acide okadaïque ne varie pas d'un puit à l'autre et est de 0,05µg/ml. Chaque volume est testé sur 12 puits et son témoin sur 6 puits. Les volumes testés sont respectivement 50, 100, 150, et 200 µl.

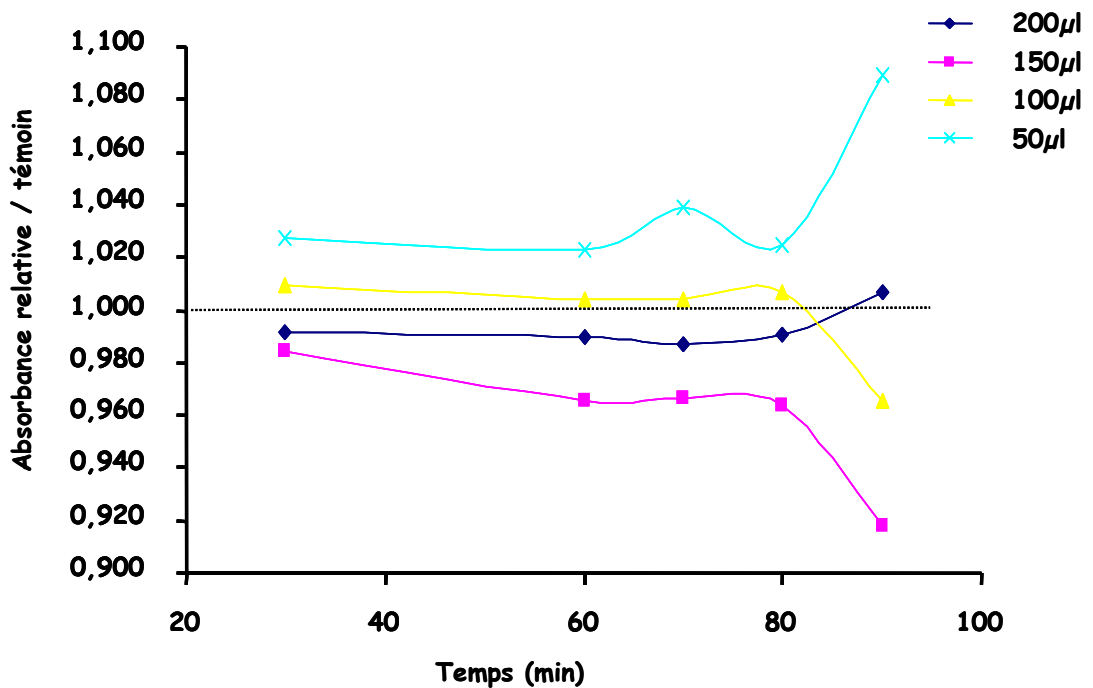
Les puits ont tous le même volume final soit 250 µl, et sont complétés si besoin avec du PBS.

La plaque est incubée à 37°C dans l'obscurité. Les mesures de l'absorbance débutent après 30 minutes d'incubation. L'évolution de l'absorption est suivie durant 90 minutes avec une mesure toute les 30 minutes au spectrophotomètre à 405 nm.

2.4.4.2. Résultats

Tableau 5 : Absorbances moyennes à 405 nm (\pm e.s.m.) après addition de différents volumes de PNPP sur du lysat de cellules KB.

Temps (min)		Volume de PNPP (μ l)			
		50	100	150	200
30	Moyenne	0,188	0,261	0,327	0,406
	esm	0,018	0,003	0,002	0,007
	Tém moy	0,183	0,259	0,333	0,410
	Tém esm	0,012	0,001	0,002	0,003
60	Moyenne	0,297	0,456	0,585	0,727
	esm	0,019	0,007	0,005	0,013
	Tém moy	0,290	0,454	0,605	0,735
	Tém esm	0,009	0,003	0,005	0,007
70	Moyenne	0,327	0,506	0,652	0,807
	esm	0,019	0,009	0,006	0,014
	Tém moy	0,314	0,504	0,675	0,817
	Tém esm	0,001	0,003	0,006	0,007
80	Moyenne	0,356	0,560	0,722	0,893
	esm	0,020	0,011	0,007	0,016
	Tém moy	0,348	0,556	0,749	0,901
	Tém esm	0,008	0,003	0,007	0,008
90	Moyenne	0,396	0,590	0,740	0,864
	esm	0,021	0,016	0,029	0,049
	Tém moy	0,364	0,611	0,806	0,858
	Tém esm	0,020	0,007	0,012	0,057



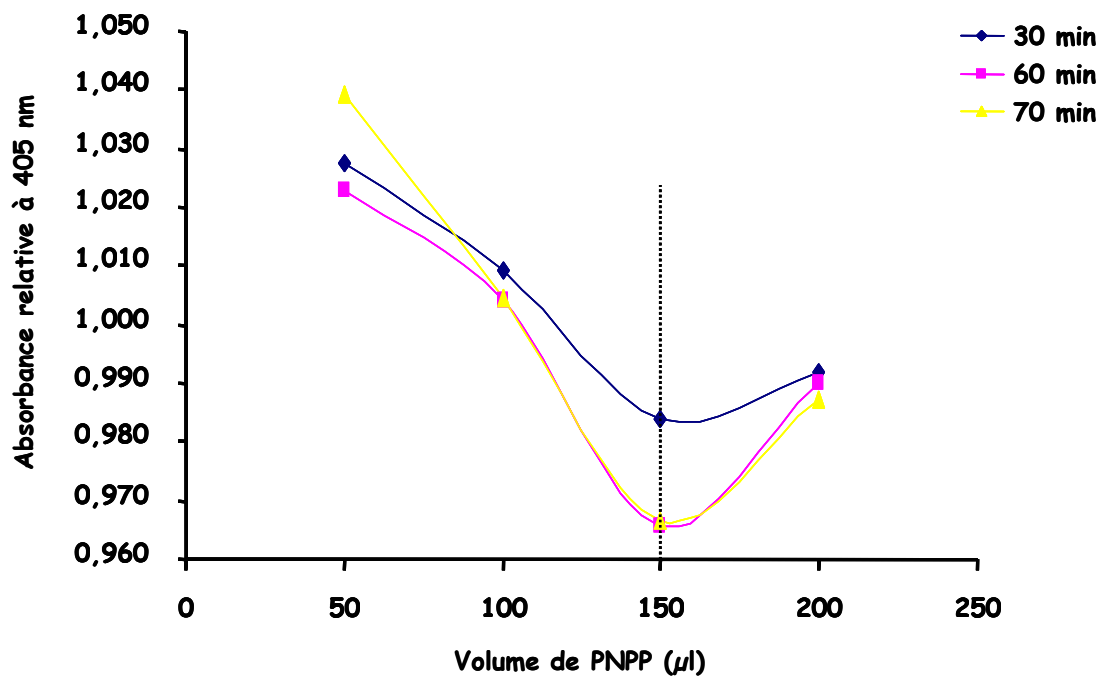
Graph 3 : Inhibition de l'activité phosphatasique du lysat de cellules KB sur le PNPP : évolution de l'absorbance à 405 nm par rapport au témoin en fonction du temps et du volume de PNPP

Sur le graphique 3, qui représente l'absorption relative des différents volumes testés en fonction du temps d'incubation (données, tableau 5), la droite en pointillé noir correspond au témoin (ordonnée 1). Le volume optimal correspond à une courbe qui se situe au dessous de la droite témoin.

D'après le graphique 3, la courbe représentant le volume de 200 µl se situe bien en dessous de la courbe du témoin mais les valeurs sont trop proches de celles du témoin pour que ce volume soit retenu.

Pour la courbe qui représente les 150 µl, la diminution de l'absorbance par rapport au témoin est plus grande donc c'est ce volume qui sera retenu.

Par ailleurs il est possible de tracer le graphique : Absorbance relative en fonction du volume de PNPP, et ce pour trois temps donnés n'excédant pas les 70 minutes (optimum déterminé auparavant).



Graph 4 : Inhibition de l'activité phosphatasique du lysat de cellules KB sur le PNPP :
 évolution de l'absorbance à 405 nm par rapport au témoin
 en fonction du temps et du volume de PNPP

D'après le graphe 4, qui représente l'évolution de l'absorbance à 405 nm par rapport au témoin en fonction du temps et du volume de PNPP, les courbes passent toutes par une absorbance minimale correspondant à un volume de PNPP de 150 µl.

Ainsi, nous pouvons conclure que le volume optimal de PNPP est de 150µl.

2.4.5. Détermination de la sensibilité

2.4.5.1. Objectif

Cette partie cherche à déterminer à partir de quelle concentration en acide okadaïque dans le milieu une diminution significative de l'absorbance est observée.

2.4.5.2. Protocoles

Le travail s'effectue sur des plaques 96 puits. Elles sont préparées suivant les modes opératoires déterminés précédemment.

Les concentrations à tester vont de 0,2 µg/ml à 0.0015625 µg/ml soit 1.5625 ng/ml d'acide okadaïque.

2.4.5.3. Résultats

Au dessous, de 0,0125 µg/ml, nous observons un phénomène de plateau : l'absorbance reste très proche de la valeur du témoin.

En utilisant comme paramètres 150 µl de PNPP, 50 µl de lysat et 50 µl d'une dilution d'acide okadaïque, une incubation à 37°C pendant 70 minutes, nous déterminons une limite de sensibilité de 0.0125 µg/ml.

2.4.6 Conclusion

La mise au point du test a donc été réalisée avec succès en obtenant un test rapide, simple, reproductible et sensible pour la détection de l'acide okadaïque pur.

La contrainte majeure de ce test étant la culture cellulaire des KB, puisqu'elles nécessitent un repiquage toutes les 48 heures.

D'autre part, il s'agit d'un test qui est dépendant de la culture des cellules KB. Ces dernières peuvent être contaminées, ou une défaillance de l'étuve peut se produire (approvisionnement en CO₂, thermostat dérégulé, etc.).

Pour pallier à cet inconvénient, il a donc été décidé de rechercher d'autres sources de protéines phosphatases.

3. Recherche de nouvelles sources de protéines phosphatases

3.1. Introduction

Pour pallier aux inconvénients de la culture de cellules KB, nous avons recherché de nouvelles sources de protéines phosphatases.

Ces protéines sont ubiquitaires, il devrait donc être facile de déceler leur présence dans différents tissus. Pour vérifier la présence de ces enzymes dans les lysats de certains organismes, nous avons utilisé le PNPP.

La recherche s'est faite sur du matériel biologiques facile à se procurer et dont le coût est relativement faible : des filets de volailles, filets de poissons et invertébrés marins.

3.2. Matériels et méthodes

3.2.1. Utilisation de cellules musculaires de vertébrés : filet de volailles.

3.2.1.1. Protocoles

La recherche s'est d'abord orientée sur des cellules animales notamment en utilisant des cellules extraites d'une volaille : *Melearis gallapavo*.

Pour caractériser la présence de protéines phosphatases dans les cellules des muscles de volailles, un test de coloration au PNPP est réalisé.

Tout comme pour les cellules KB, il faut extraire les protéines contenues dans la cellule. Dans ce but, 1 gramme de cellules musculaires est prélevé au cœur du tissu. Ce fragment est broyé grossièrement, trypsiné, puis est soumis à l'action du tampon de lyse.

Le lysat, ainsi préparé, est mis en contact avec le PNPP puis incubé à l'obscurité pendant 30 minutes à 37°C.

Au bout de 30 minutes, la plaque est lue au spectrophotomètre et l'absorbance de la solution est mesurée à 405 nm.

3.2.1.2. Résultats

Au bout de 30 minutes une coloration jaune pâle se développe dans les puits testés. Dans les puits témoins il n'y a pas eu d'évolution de la coloration (voile opalescent).

D'après ces résultats (données non présentées), nous confirmons la présence de protéines phosphatases. Cependant, la coloration qui se développe est faible et l'absorbance est nettement inférieure à la valeur obtenue avec le lysat de cellules KB. Nous pouvons expliquer ces résultats par plusieurs hypothèses : (i) les cellules musculaires n'ont pas été suffisamment lysées, (ii) les protéines phosphatases sont des enzymes fragiles et sont donc susceptible d'avoir été dénaturées. (iii) Cette faible coloration peut s'expliquer par la présence de protéines phosphatases non spécifiques.

3.2.1.3. Conclusion

La faible coloration jaune nous fait écarter l'utilisation des cellules musculaires de volailles comme source de protéines phosphatases pour ce test. Comme nous recherchons une diminution de l'absorption en présence d'acide okadaïque, cette diminution d'absorbance sera d'autant plus difficile à caractériser que la coloration de l'échantillon de départ est claire.

3.2.2. Utilisation de la chair de poisson

3.2.2.1. Protocoles

L'expérience a été menée suivant le même protocole sur de la chair de grenadier (Filet de poisson pêché 48 heures auparavant). Le prélèvement de l'échantillon se fait au centre du tissu, afin de récupérer un maximum de cellules encore viables.

La plaque contient d'une part des puits avec le lysat et le PNPP et d'autre part le lysat seul (témoin).

3.2.2.2. Résultats

Dans les puits où se trouvent le lysat et le PNPP aucune coloration ne se développe au trois temps testés 30, 60, 90 minutes d'incubation.

Plusieurs hypothèses peuvent alors être envisagées : (i) Il n'y a pas de protéines phosphatases du type recherché dans les cellules du poisson testé. (ii) Lors de la lyse des cellules il y a peut-être eu une destruction des protéines du fait de la différence de pression osmotique.

3.2.2.3. Conclusion

L'utilisation de la chair de grenadier n'est pas retenue comme source de protéines phosphatases. Cependant, il serait intéressant de tester différents poissons afin de connaître la présence ou non de protéines phosphatases.

3.2.3. Utilisation d'invertébrés marins

Comme le test est destiné à être utilisé par les professionnels du milieu côtier, il paraît judicieux de s'intéresser aux invertébrés marins se trouvant dans cet environnement.

3.2.3.1. Test de coloration simple

3.2.3.1.1. Protocoles

La chair des invertébrés est prélevée puis broyée, trypsinée et mise en contact avec du tampon de lyse.

Le lysat ainsi obtenu est mis à décanter et ensuite est filtré afin de débarrasser le lysat de toutes les impuretés macroscopiques. Le filtrat est déposé dans une plaque 96 puits et mis en contact avec 150 µl de PNPP. La plaque est incubée à l'obscurité dans l'étuve à 37°C pendant 30 minutes.

3.2.3.1.2. Résultats

Une coloration jaune très soutenue est visible. Nous pouvons donc affirmer la présence de protéines phosphatases. De plus le lysat d'invertébrés marins ne semble pas présenter d'effets de matrice.

3.2.3.1.3. Conclusion

L'utilisation des cellules d'invertébrés marins est retenue comme source de protéines phosphatases dans le cadre de ce test de détection. Cette source répond aux critères définis au début de l'étude à savoir : un approvisionnement aisé et continu, un coût de revient faible.

D'autre part, il nous reste à savoir si l'acide okadaïque inhibe bien les protéines phosphatases présentes dans les cellules d'invertébrés et si la présence d'acide okadaïque provoque bien une diminution de l'absorption à 405 nm.

3.2.3.2. Test de diminution de l'absorbance

3.2.3.2.1. Protocoles

De la même manière que pour le test utilisant le lysat de cellules KB, une plaque 96 puits est préparée à partir d'un nouveau lysat d'invertébrés, de PNPP et de différentes dilutions d'acide okadaïque.

Les volumes utilisés sont respectivement les mêmes, tout comme le sens d'introduction des réactifs.

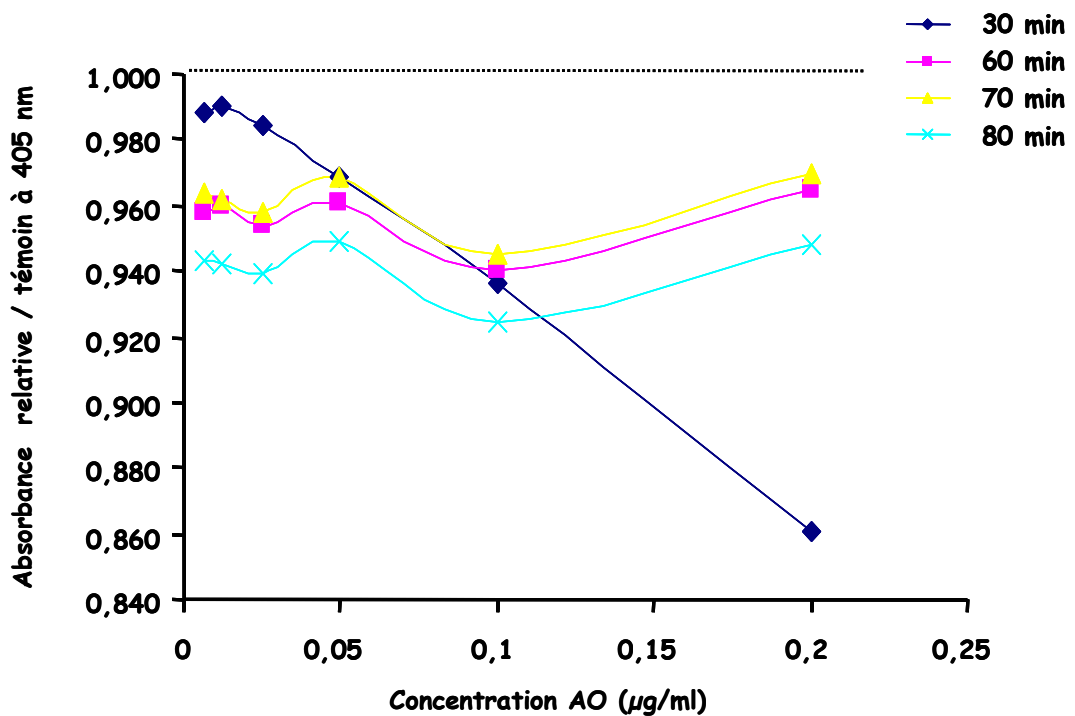
Les concentrations en acide okadaïque testées s'échelonnent entre 0.2 µg/ml et 0.00625µg/ml dans les puits.

La plaque est alors incubée dans l'obscurité à 37°C, et une lecture de l'absorbance à 405 nm est faite après 30, 60, 70, et 80 minutes d'incubation.

3.2.3.2.2. Résultats.

Tableau 6 : Absorbances moyennes à 405 nm (\pm e.s.m.) après addition d'acide okadaïque sur du lysat d'invertébrés.

AO (μ l/ml)	Temps (min)							
	30		60		70		80	
	Moyenne	esm	Moyenne	esm	Moyenne	esm	Moyenne	esm
0	0,926	0,001	1,145	0,005	1,192	0,002	1,282	0,003
0,00625	0,915	0,019	1,097	0,024	1,148	0,023	1,210	0,024
0,0125	0,917	0,018	1,099	0,019	1,146	0,022	1,208	0,023
0,025	0,912	0,005	1,092	0,003	1,141	0,003	1,204	0,002
0,05	0,897	0,015	1,100	0,019	1,154	0,019	1,216	0,019
0,1	0,867	0,008	1,077	0,032	1,127	0,035	1,185	0,037
0,2	0,797	0,021	1,105	0,013	1,156	0,011	1,215	0,010



Grphe 5 : Inhibition de l'activité phosphatasique du lysat d'invertébrés marins sur le PNPP :
 évolution de l'absorbance à 405 nm par rapport au témoin
 en fonction de la concentration en acide okadaïque et du temps.

D'après le graphe 5 qui représente l'évolution de l'absorbance à 405 nm par rapport au témoin en fonction de la concentration en acide okadaïque et du temps (données, tableau 6), nous observons une diminution de l'absorbance de la solution à 30 minutes. De plus, cette diminution de l'absorbance est d'autant plus grande que la concentration en acide okadaïque est élevée.

Pour obtenir des résultats similaires avec des protéines phosphatases extraites de cellules KB, nous devons nous placer à une mesure à 70 minutes et la diminution de l'absorbance n'est pas aussi nette que dans ce cas.

Ceci peut s'expliquer par le fait que les enzymes contenues dans les invertébrés marins n'agissent habituellement pas à 37°C, et que dans ce protocole, de ce fait, elles sont en hyper activé.

De plus, des travaux supplémentaires ont permis de montrer, que sans trypsiner, ni ajouter de tampon de lyse, il est possible d'obtenir une coloration jaune en mettant un broyat d'invertébrés marins en présence de PNPP.

Ceci permet de supposer la présence de protéines phosphatases dans le liquide baignant l'invertébré.

Pour compléter cette étude, il serait intéressant de savoir s'il est possible d'utiliser le broyat d'invertébrés, plutôt que le lysat.

3.2.4. Comparaison des résultats obtenus entre le lysat de cellules KB et le lysat d'invertébrés marins

3.2.4.1. Protocoles

Dans l'objectif d'optimiser la mise au point du test, une comparaison des résultats, obtenus d'un côté avec le lysat de cellules KB et de l'autre avec le lysat d'invertébrés est réalisée.

Nous avons tracé une courbe pour chaque lysat. Cette courbe correspondant aux conditions optimums dans chacun des deux cas.

Pour le lysat de cellules KB, ce sont les résultats obtenus, à 37°C en présence de 150 µl de PNPP et de 50 µl de lysat pour 70 minutes d'incubation.

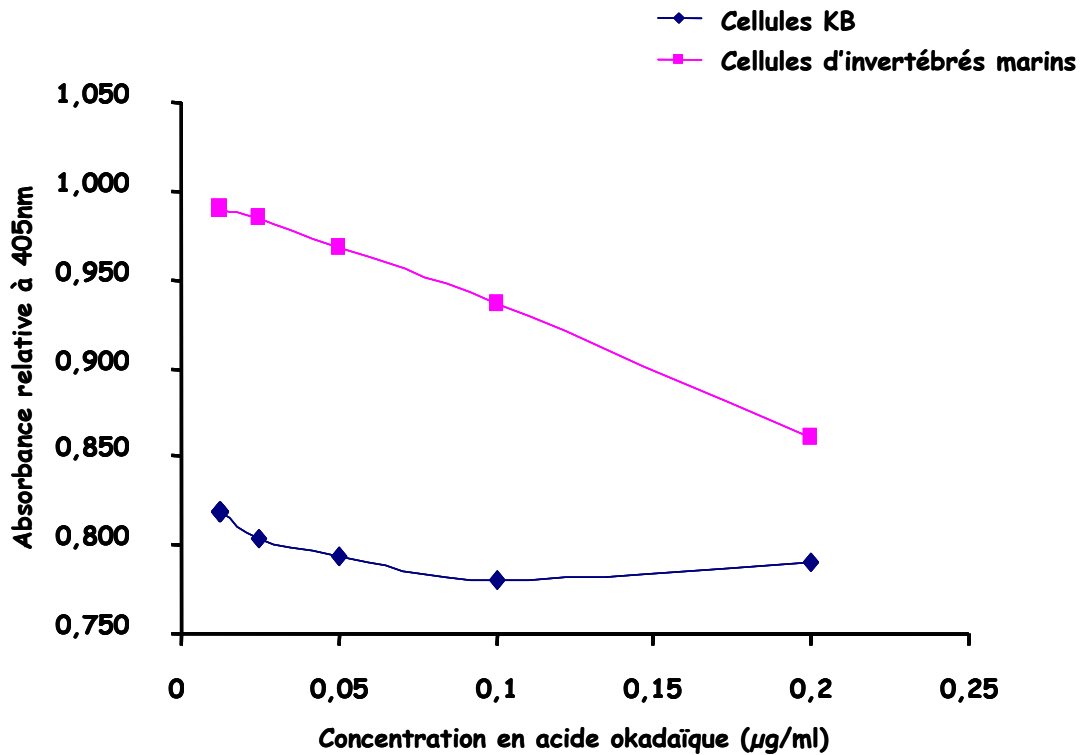
Pour le lysat d'invertébrés, il s'agit des résultats obtenus, à 37°C avec 150 µl de PNPP et 50 µl de lysat pour 30 minutes d'incubation.

Pour chaque lysat, les mêmes concentrations en acide okadaïque ont été utilisées.

3.2.4.2. Résultats

Tableau 7 : Absorbances moyennes à 405 nm après addition d'acide okadaïque sur du lysat d'invertébrés marins et sur du lysat de cellules KB

AO ($\mu\text{g/ml}$)	Cellules KB	Lysat d'invertébrés
0,2	0,791	0,861
0,1	0,780	0,936
0,05	0,793	0,969
0,025	0,803	0,984
0,0125	0,818	0,990



Graph 6 : Inhibition de l'activité phosphatasique du lysat d'invertébrés marins sur le PNPP et du lysat de cellules KB en fonction de l'absorbance à 405 nm en fonction de la concentration en acide okadaïque et du temps.

D'après le graphe 6 (données, tableau 7), la diminution de l'absorbance moyenne relative est plus importante avec le lysat d'invertébrés marins, qu'avec le lysat de cellules KB. Ceci permet donc une lecture plus facile.

D'autres part, la courbe obtenue pour le lysat d'invertébrés est quasi linéaire ce qui suppose que l'affinité de l'acide okadaïque pour les protéines phosphatases dans le lysat d'invertébrés marins est plus grande.

CONCLUSION

L'acide okadaïque, principale toxine produite par les dinoflagellés du genre *Dinophysis* peut s'accumuler dans les bivalves et provoquer des gastro-entérites, connues sous le nom D.S.P. (Diarrheic Shellfish Poisoning), chez les consommateurs de ces coquillages.

La mise au point d'une méthode de détection rapide et fiable de la présence des toxines dans les coquillages contaminés, pour remplacer l'actuel test sur souris, est nécessaire du fait de la réglementation française régissant les essais sur les animaux de laboratoire.

Notre travail a consisté à la mise au point d'un nouveau test de détection colorimétrique de l'acide okadaïque.

Cette méthode repose sur la propriété de l'acide okadaïque d'inhiber les protéines phosphatases.

Nous avons ainsi développé une technique utilisant une préparation de protéines phosphatases extraites de cellules d'invertébrés marins agissant sur le substrat incolore le paranitrophényle phosphate qui est transformé en paranitrophénol jaune.

Ce test a pour originalité une mise en œuvre simple et rapide et une obtention des résultats par simple lecture au spectrophotomètre.

Comme nous l'avons montré, cette technique est basée sur une diminution de l'absorbance à 405 nm de l'échantillon testé. Cette diminution est attribuée à l'inhibition des protéines phosphatases par l'acide okadaïque présent dans le milieu.

Le test mis en place peut être réalisé en quelques heures, et semble donc être une méthode alternative idéale au test souris. Une étude utilisant des extraits de moules contaminées devra être réalisée et une étude de comparaison avec le test souris sera nécessaire à la validation du test.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Amzil Z.** (1993) Phycotoxines des efflorescences algales : L'acide okadaïque Optimisation de la purification. Nouvelle méthode de détection biologique. Thèse de doctorat Université de Nantes.
2. **Amzil Z., Pouchus Y.F., Le Boterff J., Roussakis C., Verbist J.F., Marcaillou-Lebaut C. et Madelin P.** (1992) Short-time cytotoxicity of mussels extracts : a new bioassay for okadaic acid detection. *Toxicon*. **30**: 1419-1425.
3. **Anderson D.** (1994) Eaux colorées et phytoplancton toxique. *Pour la science*. **204** : 68-76.
4. **Aonuma S., Ushijima T., Nakayasu M., Shima H., Sugimura T. et Nagao M.** (1991) Mutation induction by okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor, in CHL cells, but not in *S. typhimurium*. *Mutation research*. **250**: 375-381.
5. **Aubert M.** (1990) La prolifération estivale du plancton toxique. *La Recherche*. **218** : 916-919.
6. **Baldacini O., Lutun P., Girardot R. et Monteil H.** (1993) Effect of okadaic acid on the cytotoxic activity of *Clostridium difficile* Toxin B and *Clostridium sordelli* Toxin L. *Natural toxins*. **1**: 361-368.
7. **Belin C. et Berthome J.P.** (1991) Le réseau Français de suivi du phytoplancton : REPHY in *Actes du colloque sur les biotoxines marines*. 189-194.
8. **Berthome J.P., Belin C. et Lassus P.** (1985) Eaux colorées, plancton toxique et cultures marines. *Equinoxe*. **5** : 9-16.
9. **Bialojan C., Takai A.** (1988) Inhibitory effect of marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases: specificity and kinetics. *Biochem. J.* **256**: 283-290.
10. **Blay J. and Poon A. S. L.** (1995) Use of cultured permanent lines of intestinal epithelial cells for the assay of okadaic acid in mussel homogenate. *Toxicon*, **33**: 739-746.

11. **Boland M. P., Taylor M. F. J. R and Holmes C. F. B.** (1993) Identification and characterisation of a type-1 protein phosphatase from the okadaic acid-producing marine dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *FEBS Letters*, **334**: 13-17.
12. **Cohen P., Holmes C.F.B. et Tsukitani Y.** (1990) Okadaic acid : a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem. Sci.* **15**: 98-102.
13. **Dogde J.D.** (1984) Dinoflagellate Taxonomy. *Dinoflagellates* Edit Spector. 17-42.
14. **Draisci R., L. Giannetti, Lucentini L., Marchiafava C., James K. J., Bishop A. G., Healy B. M. and Kelly S. S.** (1998) Isolation of a new okadaic acid analogue from phytoplankton implicated in diarrhetic shellfish poisoning. *Journal of Chromatography A*, **798**: 137-145.
15. **Edebo L., Langes S., Li X.P., Allenmark S. et Jennische E.** (19889) Diarrhetic shellfish toxins induce rapid swelling of the intestinal epithelium and hypersecretion in the rat small intestine. *Bioact. Mol.* **10**: 437-444.
16. **Fernandez M.L., Miguez A., Cacho E. et Martinez A.** (1996) Detection of okadaic acid esters in the hexane extracts of spanish mussels. *Toxicon.* **34**: 381-387.
17. **Fladmark K., Hauge Serres M., Larsen N., Yasumoto T., Aune T. and Ove Døskeland S.** (1998) Sensitive detection of apoptogenic toxins in suspension cultures of rat and salmon hepatocytes. *Toxicon* **36**: 1101-1114.
18. **Fragas S., Marino J., Bravo I., Campos M.J., Sanchez F.J., Costas E., Cabanas J.M. et Blanco J.** (1984) Red tides and shellfish poisoning in Galicia, N.W. Spain. *ICES special meeting.* **C 5**:
19. **Freudenthal A.R. et Jijina J.L.** (1985) Shellfish poisoning episodes involving or coincidental with dinoflagellates. *Toxic dinoflagellates.* Anderson D.M. Ed Elsevier, New York, 461-466.

20. **Honkanen R. E., Codiposti B.A., Tse K. et Boynton A.L.** (1994) Characterization of natural toxins with inhibitory activity against serine/threonine protein phosphatases. *Toxicon*. **32**: 339-350.
21. **Hu T. et Marr J.** (1992) New diol esters isolated from cultures of the dinoflagellates *Prorocentrum lima* and *Prorocentrum concavum*. *J of Natural Products*. **55**: 1631-1637.
22. **Hummert C., Shen J. L. and Luckas B.** (1996) Automatic high-performance liquid chromatographic method for the determination of diarrhetic shellfish poison. *Journal of Chromatography A* **729**: 387-392
23. **IFREMER** (2003) Guides pour les toxines diarrhéiques (DSP) et associées. Extrait du document de prescription interne Ifremer : toxines diarrhéiques (DSP) et associées. Guide et Manuel.
24. **Ito E., Satake M., Ofuji K., Kurita N., McMahon T., James K.J., Yasumoto T.** (2000). Multiple organ damage caused by new toxin azaspiracid, isolated from mussels produced in Ireland. *Toxicon*, **38**: 917-930.
25. **Iwasaki H.** (1979) Physiological ecology of red tides flagellates. *Biochemistry and physiology of Protozoa*. Ed Academic Press, Inc. **1**: 357-394.
26. **James K., Moroney C., Roden C., Satake M., Yasumoto T., Lehane M., Furey A.** (2003) Ubiquitous 'benign' alga emerges as the cause of shellfish contamination responsible for the human toxic syndrome, azaspiracid poisoning. *Toxicon* **41**: 145-151.
27. **James K., Bishop A.G., Gillman M., Kelly S.S., Roden C., Draisci R., Lucentini L., Giannetti L.** (1998) The diarrhoeic shellfish poisoning toxins of *Dinophysis acuta* : identification and isolation of Dinophysistoxin-2 (DTX-2). *Harmful Algae*. Reguera B., Blanco J., Fernandez M.L. & Wyatt T. (eds). Xunta de Galicia and IOC of UNESCO, 489-492.

28. **James K.J., Carmody E.P., Gillman M., Kelly S.S., Draisci R., Lucentini L. and Giannetti L.** (1997) Identification of a new diarrhoeic toxin in shellfish using liquid chromatography with fluorimetric and mass spectrometric detection. *Toxicon*, **35**: 973-978.
29. **Kat M.** (1983) Diarrhoeic mussel poisoning in the Netherlands related to the occurrence to dinoflagellate *Dinophysis acuminata*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **49** : 417-427.
30. **Krogh P., Edler L. et Granelli E.** (1985) Outbreak of diarrhetic shellfish poisoning on the West coast of Sweden. *Toxic Dinoflagellates*. Anderson D.M. Ed Elsevier, New York, 501-502.
31. **Labrousse H. et Matile L.** (1996) Toxicological biotest on Diptera larvae to detect ciguatoxins and various other toxic substances. *Toxicon*, **34**: 881-891.
32. **Lagoïn Y.** (1991) Phytoplankton et biotoxines. Note d'information du conseil général vétérinaire 2^{ème} section. 1-25.
33. **Lassus P.** (1989) Planctons toxiques et planctons d'eaux rouges sur les côtes européennes. IFREMER. 111 pages.
34. **Lassus P., Herbland A. et Marcaillou-Lebaut C ;** (1991) Toxic blooms and toxic effects along the french coast. *World Aquaculture*. **22**: 19-54.
35. **Lee J.S., Yanagi T., Kenma R. et Yasumoto T.** (1987) Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by high-performance liquid chromatography. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 877-881.
36. **Luu H.A., Chen D.Z.X., Magoon J., Worms J., Smith J. et Holmes C.F.B.** (1993) Quantification of diarrhetic shellfish toxins and identification of novel protein phosphatase inhibitors in marine phytoplankton and mussels. *Toxicon*. **31**: 75-83.

37. **Marcaillou-Lebaut C. et Truquet P.** (1985) validité du test souris pour le contrôle routinier de secteurs miticoles contaminés par la toxine du *Dinophysis*. *Rev. Int. Pêches Marit.* **47**: 158-165.
38. **Marcaillou-Lebaut C., Lucas D. et Le Dean L.** (1985) *Dinophysis acuminata* toxin : status of toxicity bioassays in France. *Toxic Dinoflagellates* White, Baden Ed Elsevier, New York, 485-488.
39. **Masselin P., Lassus P., Bardouil M.** (1992) High performance liquid chromatography analysis of diarrhoeic toxins in *Dinophysis* spp. from the French coast. *Journal of Applied Phycol.* **4**: 385-389.
40. **Mc Ilvain J.M.jr., Burkhardt J.K., Hamm-Alvarez S., Argon Y; et Sheetz M.P.** (1994) Regulation of kinesin activation by phosphorylation of kinesin-associated proteins. *J. Biol. Chem.* **269**: 19176-19182.
41. **Murata M., Shimatani M., Sugitani H., Oshima Y., Yasumoto T.** (1982) Isolation and structural elucidation of the causative toxin of diarrhoeic shellfish poisoning. *Bull. Jap. Soc., Fish.*, **48(4)**: 549-552.
42. **Nam K.Y., Horo M., Kimura S., Fujiki H. et Imanishi Y.** (1990) Permeability of a non-TPA-type tumor promoter, okadaic acid, through lipid bilayer membrane. *Carcinogenesis.* **11(7)**: 1171-1174.
43. **Nézan E. et Piclet G.** (1989) Alerte aux coquillages empoisonnés. *La Recherche.* **212** : 956-957.
44. **Ofuji K., Satake M., McMahon T., James K.J., Naoki H., Oshima Y., Yasumoto T.** (2001) Structures of azaspiracid analogs, azaspiracid-4 and azaspiracid-5, causative toxins of azaspiracids poisoning in Europe. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65** : 740-742.

45. **Paulson J.R., Ciesielski W.A., Schram B.R. et Mesner P.W.** (1994) Okadaic acid induces dephosphorylation of histone H1 in metaphase-arrested HeLa cells. *J. Cell. Sci.* **107**: 267-273.
46. **Pincemin J.M.** (1969) Le problème de l'eau rouge. *Rev. Int. Ocean. Méd.* **Tome XIII-XIV** : 181-203.
47. **Puech L.** (2000) Etude de l'acide okadaïque une phycotoxine marine. Thèse de doctorat Université de Paris.
48. **Reboud J.P.** (1996) Institut de Chimie des Protéine, IBCP-CNRS-Lyon. Communication personnelle.
49. **Rime H., Huchon D., Jesus C., Goris J., Merlevede W. et Oron R.** (1990) Characterization of MPF activation by okadaic acid in *Xenopus oocyte*. *Cell. Diffe. Devel.* **29**: 47-58.
50. **Satake M., Mackenzie L., Yasumoto T.** (1997) Identification of *Protoceratium reticulatum* as the biogenetic origin of yessotoxin.. *Natural Toxins*, **5**: 164-167.
51. **Shibata S. Ishida Y., Kitano H., Oshizumi Y., Habon J., Stukitami Y. et Kikushi H.** (1982) Contractile effects of okadaic acid, a novel ionophore like substance from black sponge, on isolated smooth muscles under the condition of calcium deficiency. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **223**: 198-202.
52. **Sournia A., Erar Le Denn E., Grzebyk D., Lassus P. et Partensky F.** (1990) Plancton nuisible sur les côtes de France. *Pour la science.* **153** : 60-67.
53. **Stamman E., Segar D.A. et David P.G.** (1987) A preliminary epidemiological assessment of the potential for diarrhetic shellfish poisoning in the northeast United States. *NOAA Techn. Mem.*, **34**.

54. **Suzuki T., Mackenzie L., Stirling D., Adamson J.** (2001). Pectenotoxin-2 seco acid: a toxin converted from pectenotoxin-2 by the New Zealand Greenshell mussel, *Perna canaliculus*. *Toxicon*, **39** : 507-514.
55. **Takai A., Murata M., Torigoe K., Isobe M., Mieskes G. et Yasumoto T.** (1992) Inhibitory effect of okadaic acid derivatives on protein phosphatases. *Biochem. J.* **284**: 539-544.
56. **Terao K., Ito E., Yanagi T. et Yasumoto T.** (1986) Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning. I. ultrastructural changes in the small intestine and liver of suckling mice induced by dinophysistoxin-1 and pectenotoxin-1. *Toxicon*. **24**: 1141-1151.
57. **Usagawa T., Nishimura M., Itoh Y., Uda T. et Yasumoto T.** (1989) Preparation of monoclonal antibodies against okadaic acid prepared from the sponge *Halichondria okadai*. *Toxicon*. **27**: 1323-1330.
58. **Vernoux J.P., Marcaillou-Lebaut C., Masselin P., Marais C., Baron B., Choumiloff R., Proniewski F., Nizard G. et Bohec M.** (1993) The use of *Daphnia magna* for determination of okadaic acid in mussel extracts. *Food Add. & Cont.* **10**: 603-608.
59. **Wright J.L.C. et Cembella A.D.,** (1998). Ecophysiology and Biosynthesis of polyether marine biotoxins. Nato ASI Series, **vol. G 41**, 427-451.
60. **Yamashita K., Yasuda J., Pines K., Yasumoto H., Nishitani M., Ohtsubo T. et Nishimoto T.** (1990) Okadaic acid, a potent inhibitor of type 1 and 2A protein phosphatases, activities cdc 2/H1 kinase and transiently induces a premature mitosis-like stage in BHK2 1 cells. *EMBO J.* **9**: 4331-4338.
61. **Yasumoto T. et Satake M.** (1998) New toxins and their toxicological evaluations. Harmful algae. Reguera B., Blanco J., Fernandez M.L. & Wyatt T. (eds) Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 461-464.

62. **Yasumoto T., Nakajima I., Oshima Y. et Bagnis R.** (1979) Toxic dinoflagellate blooms. D.L. Taylor and H.H. Seliger eds. North-Holland, New York, pp 65-70.
63. **Yasumoto T., Oshima Y., Sugawara W. Fukuyo Y., OguriH., Igarashi T. et Kujita N.** (1980) Identification of *Dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning. *Bull. Jap. Soc; Scient. Fish.* **46**: 1405-1411.

Vu, Le Président du Jury

Vu, Le Directeur de Thèse

Vu, Le Directeur de L'U.E.R.

Nom-Prénoms : LE BOT Ronan, Daniel

Titre de la thèse : Détection colorimétrique des toxines diarrhéiques par inhibition des protéines phosphatases préparées extemporanément

Résumé de la thèse : Depuis la première mise en évidence des toxines diarrhéiques en 1978 et la mise au point d'un bioessai sur souris pour les détecter, de très nombreuses recherches ont été menées pour améliorer ce test ou développer de nouvelles méthodes. L'acide okadaïque principale toxine produite par les dinoflagellés du genre *Dinophysis* peut se concentrer dans les bivalves et provoquer des gastro-entérites chez les consommateurs. La méthode proposée est une détection colorimétrique de l'acide okadaïque basée sur l'activité enzymatique des protéines phosphatases. L'activité de ces enzymes est mise en évidence par la réaction du paranitrophénylphosphate incolore qui est transformé par des protéines phosphatases en paranitrophénol jaune. Les protéines phosphatases utilisées proviennent de différentes sources (filets de volailles, filets de poissons et invertébrés marins) et sont préparées extemporanément.

MOTS CLES :

-ACIDE OKADAÏQUE
-PROTEINES PHOSPHATASES
-PARANITROPHENYLPHOSPHATE
-DINOFLAGELLES
-DETECTION

JURY :

PRESIDENT : Monsieur Yves-François POUCHUS, Professeur en Cryptogamie et Botanique, Faculté de Pharmacie de Nantes

ASSESEURS : Monsieur Olivier GROVEL, Maître de conférences en Pharmacognosie, Faculté de Pharmacie de Nantes
Madame Anne-Carole DOSSMANN, Docteur en pharmacie, Pharmacien d'officine, 2 Place Delorme 44000 Nantes

Adresse de l'auteur : 34 avenue Camus 44000 Nantes