

Département Ressources Biologiques et Environnement
Laboratoires Phycotoxines

09-2012 - R.RBE/EMP/PHYC 12-05



Ifremer

Pinnatoxines en lien avec l'espèce
Vulcanodinium rugosum

Rapport Ifremer pour DGAL
(Mai 2011 à août 2012)

Convention d'Etude Programme 206
Sous-action 37 n° : 2011/203/2100482701
Référence Ifremer: 11/1219401/NYF

Pinnatoxines en lien avec l'espèce *Vulcanodinium rugosum*

Rapport préparé par
Philipp Hess¹, Fabienne Hervé¹, Eric Abadie², Véronique Séchet¹,
Jordi Molgo³, Zouher Amzil¹, Valérie Fessard⁴
21 septembre 2012

¹ Laboratoire Phycotoxines, IFREMER, Rue de l'Île d'Yeu, 44311 Nantes

² Laboratoire LER-LR de Sète, IFREMER, BP 171, 34203 SETE

³ CNRS, Lab. Neurobiologie & Développement, UPR 3294, 1, Av. de la Terrasse, 91198-Gif sur Yvette

⁴ ANSES, Unité de toxicologie des contaminants, BP 90203, 35302 Fougères

Fiche documentaire

Numéro d'identification du rapport : RBE/EMP/PHYC 12-05 Diffusion : libre : <input checked="" type="checkbox"/> restreinte : <input type="checkbox"/> interdite : <input type="checkbox"/>		date de publication : 21/09/2012 nombre de pages : 20 + annexes bibliographie : s/o illustration(s) : oui langue du rapport : Français
Validé par : Philipp Hess Adresse électronique : philipp.hess@ifremer.fr		
Titre de l'article « Pinnatoxines en lien avec l'espèce <i>Vulcanodinium rugosum</i> »		
Contrat n° 11/1219401/NYF Rapport intermédiaire <input type="checkbox"/> Rapport définitif <input checked="" type="checkbox"/>		
Auteur(s) principal(aux) : Philipp Hess, Fabienne Hervé, Eric Abadie, Véronique Séchet, Jordi Molgo, Zouher Amzil, Valérie Fessard	Organisme / Direction / Service, laboratoire Ifremer (PDG/RBE/EMP/D), Anses, CNRS	
Encadrement(s) : s/o		
Cadre de la recherche : Convention d'Etude DGAL		
Destinataire : DGAL		
Mots-clés Pinnatoxine, Santé alimentaire, Etang d'Ingril		

Table des matières:

1) Résumé exécutif	6
2) Contexte de l'étude et objectifs	7
3) Suivi de <i>Vulcanodinium rugosum</i> à Ingrilet mise en culture	10
4) Obtention d'un étalon caractérisé pour la Pinnatoxine G	11
5) Suivi des Pinnatoxines dans les moules et palourdes à Ingril	13
6) Faisabilité de la culture en masse de <i>Vulcanodinium rugosum</i>	16
7) Etude toxicologique de la Pinnatoxine G	19
8) Perspectives	23
<i>Annexe 1 : Rapport du CNRC – Halifax sur a caractérisation de l'étalon</i>	<i>24</i>
<i>Annexe 2 : Rapport du CDD culture en masse (Ifremer)</i>	<i>25</i>
<i>Annexe 3 : Rapport de stage M1 paramètres écophysiologicals (Ifremer)</i>	<i>26</i>
<i>Annexe 4 : Rapport sur l'étude toxicologique (ANSES Fougères)</i>	<i>27</i>
<i>Annexe 5 : Toxicité in vivo de la Pinnatoxine G (Rex Munday)</i>	<i>28</i>
<i>Annexe 6 : Avis de Prof. Aurelia Tubaro pour les études in vivo</i>	<i>29</i>
<i>Annexe 7 : Isolement de composés bioactifs dans <i>V. rugosum</i> (COLNACOQ)</i>	<i>30</i>
<i>Annexe 8 : Méthode analytique utilisée pour l'analyse CL-SM/SM</i>	<i>31</i>

1) Résumé exécutif

Suite à la découverte de la Pinnatoxine G comme agent responsable des toxicités atypiques à Ingril fin 2010, une étude a été commanditée afin d'approfondir les connaissances sur l'organisme producteur de cette toxine, *Vulcanodinium rugosum*, les toxines associées et leur toxicité.

L'organisme, étant considéré « cryptique » dû à sa faible présence dans le milieu, a été suivi de manière plus proche à Ingril. Il est apparu dans la colonne d'eau en juillet et août 2012, et quelques échantillons ont pu être prélevés pour la mise en culture de souches supplémentaires. Une corrélation directe entre la croissance de l'organisme et la température est soupçonnée mais n'a pas encore pu être corroborée sur la période d'étude, faute d'un nombre suffisant d'échantillons. La salinité a été relevée comme étant potentiellement un autre facteur affectant la prolifération de cet organisme.

La Pinnatoxine G purifiée a pu être obtenue auprès de collaborateurs néozélandais par le biais du CNRC Halifax. Les collaborateurs du CNRC ont caractérisé ce produit comme étant pur, et une solution d'étalon a été produite. La stabilité de cette solution a été testée, et l'étalon étant très stable a pu être utilisé pour l'analyse des échantillons par spectrométrie de masse. Une méthode analytique a été mise en place pour l'analyse des différents analogues de la Pinnatoxine et des Ptériatoxines (A à G et PtTX-A à C). Les facteurs de réponse des autres analogues sont supposés égaux à 1.

L'analyse des pinnatoxines à Ingril clarifie que la Pinnatoxine G est l'analogue le plus abondant avec un faible pourcentage de la Pinnatoxine A (connu pour être un métabolite de la Pinnatoxine G produit par le coquillage). Les concentrations varient fortement d'année en année, mais les concentrations maximales ont dépassé $600 \mu\text{g kg}^{-1}$ pour les trois ans 2010 à 2012 et ont dépassé $1200 \mu\text{g kg}^{-1}$ en 2010. Ainsi, Ingril présente les concentrations les plus élevées mondialement, dépassant d'un facteur six les plus fortes teneurs rapportées (Nouvelle Zélande).

La comparaison entre moules et palourdes montrent que les moules accumulent la Pinnatoxine G toujours de manière préférentielle, et que la moule reste donc l'espèce sentinelle par excellence. Les palourdes ont une très légère tendance à métaboliser plus largement ce composé, le pourcentage de PnTX-A constituant 1.9% de la Pinnatoxine G dans les palourdes par rapport aux 1.1% dans les moules.

La culture en masse de l'organisme a été réalisée en mode batch dû à l'adhérence notoire des cellules aux parois des contenants des cultures. Différents facteurs environnementaux et nutritionnels ont été examinés pour leurs effets sur la croissance et la production toxinique de l'organisme. La salinité, les sources d'azote et potentiellement la température sont des facteurs à respecter. Un total d'environ 290 g de masse algale a été produit à partir de 350 litres de cultures. Cette biomasse contenait 3,1 mg de Pinnatoxine G. Bien que l'étude fût coûteuse dû au temps agents passé, elle permettrait de produire de la biomasse suffisante pour la préparation durable d'étalon.

Aucune toxicité cellulaire de la Pinnatoxine G n'a été obtenue sur les trois modèles cellulaires utilisés (Caco2, Neuro2a et KB), dans les conditions testées. Toutefois, les extraits bruts de *Vulcanodinium rugosum* se sont révélés être très toxiques sur ces modèles. De plus, même si la toxine pure n'interfère pas avec l'intégrité de la barrière cellulaire (modèle de la barrière intestinale), elle passe aisément à travers cette barrière sur une exposition de 24 h. Cette observation est en cohérence avec une étude qui a été conduite par un groupe néozélandais qui a examiné la toxicité orale dans le modèle souris. Cette étude a été examinée de près par nos collaborateurs et des pistes pour confirmer et approfondir ces résultats ont été indiquées. Le manque de données épidémiologiques pourrait être relié à l'absence de récolte des moules dans l'étang d'Ingril pour la consommation humaine.

2) Contexte de l'étude

2.1. Contexte de la proposition d'un projet d'étude

Les pinnatoxines (PnTX) sont un groupe de biotoxines marines lipophiles (Figure 1), appartenant à la famille des imines cycliques et provoquant une mort rapide des souris par voie intra-péritonéale (dans le test souris tel qu'appliqué au niveau européen jusqu'à maintenant). Récemment, un organisme producteur de pinnatoxines a été identifié en Nouvelle Zélande (Rhodes et al., 2010 ; Selwood et al., 2010), et des toxines de ce groupe ont également été mise en évidence en Norvège, pour la première fois en Europe (Miles et al., 2009). Dans le cadre du projet COLNACOQ, il a été décidé d'examiner la présence de ce groupe de toxines dans les coquillages français.

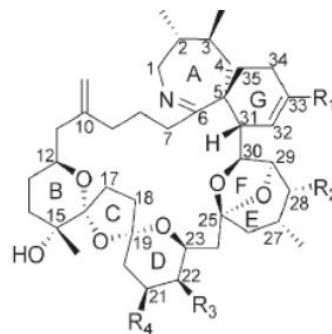


Figure 1. Structure chimique des pinna- et pteria-toxines, selon Selwood et al., 2010

Après l'observation en 2001 et en 2009 d'un dinoflagellé scripsielloïde non-identifié dans des échantillons d'eaux méditerranéennes, cet organisme a pu être identifié et nommé *Vulcanodinium rugosum* (Figure 2, Nézan et Chomérat, 2011). Sa mise en culture en 2010 a permis l'identification de la pinnatoxine-G comme métabolite algal (Ifremer, information non-publiée).

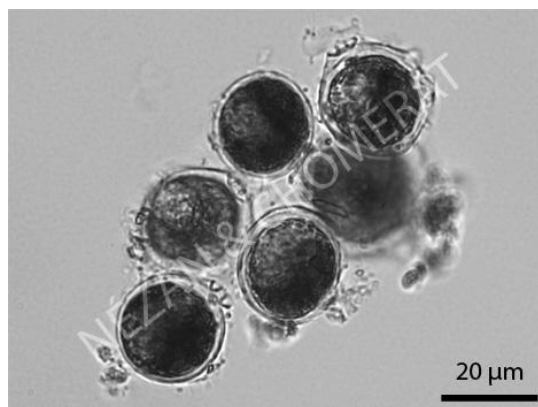


Figure 2. *Vulcanodinium rugosum*, E. Nézan

En parallèle, l'analyse rétrospective des pinnatoxines par CL-SM/SM a été effectuée sur des échantillons de moules et d'huîtres des côtes françaises, prélevés en 2010 dans le cadre du dispositif de vigilance. Tandis que les concentrations ne dépassent généralement pas $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, une série temporelle dans les moules d'Ingril a montré un pic de concentration mi-août 2010 avoisinant les $800 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Figure 3). Ces concentrations ne sont que des estimations, dues à l'absence d'un étalon certifié. Néanmoins, la mise en évidence de telles concentrations semble pouvoir expliquer les tests

souris positifs atypiques observés à Ingril auparavant (5 % de tous les tests souris atypiques sur la période de 2003 à 2008 à l'échelle nationale), Belin et al., 2009.

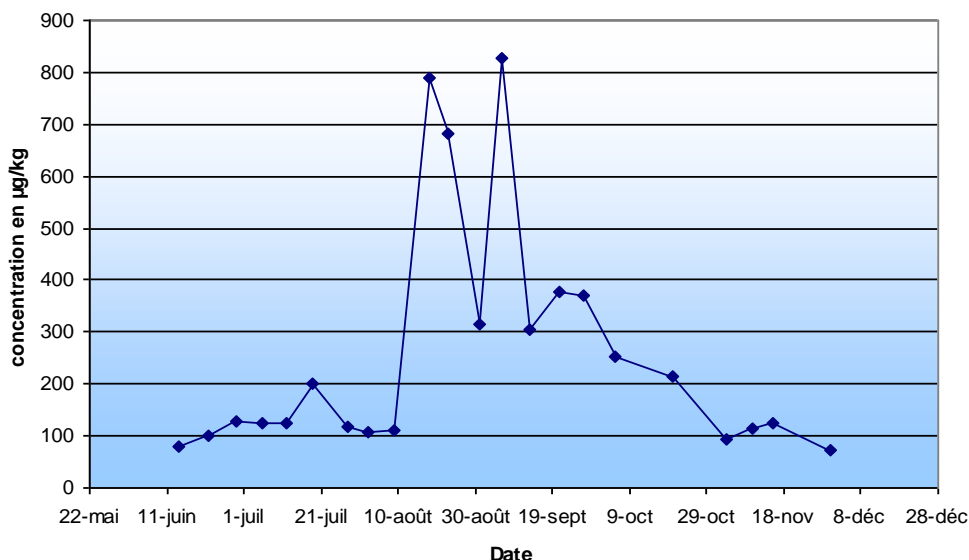


Figure 3. Evolution des niveaux de pinnatoxine-G à l'étang d'Ingril courant 2010 (moules)

Suite à la communication de ces éléments aux membres du comité de vigilance lors des réunions du 14/1/2011 et du 22/2/2011, il a été décidé d'approfondir ces informations par une étude des pinnatoxines dans les coquillages français en se focalisant dans un premier temps sur l'Etang d'Ingril.

Belin C., Soudant D. and Amzil Z. (2009) Surveillance des toxines lipophiles dans les coquillages. Analyses statistique et comparaison des résultats obtenus par deux méthodes d'analyse : les bio-essais sur souris et les analyses chimiques par CL-SM/SM. Rapport exécuté dans le cadre de la Convention Etudes DGAL / Ifremer, correspondant à la Subvention pour charges de service public, Programme 206, 97 p. <http://wwz.ifremer.fr/envlit/documents/publications> (rubrique Phytoplancton et Phycotoxines, last accessed : 11/03/2011).

Miles C.O., Rundberget T., Sandvik M., Aasen J.A.B., Selwood A. (2009) The presence of pinnatoxins in norwegian mussels. National Veterinary Institute's Report series 7b-2010. Oslo: National Veterinary Institute.

Nézan E. and Chomérat N (2011) *Vulcanodinium rugosum* gen. et sp. nov. (Dinophyceae), un nouveau dinoflagellé marin de la côte méditerranéenne française. *Crypt. Alg.* 32 (1) 3-18.

Rhodes L., Smith K., Selwood A., McNabb P., van Ginkel R., Holland P. and Munday R. (2010). Production of pinnatoxins by a peridinoid dinoflagellate isolated from Northland, New Zealand. *Harmful Algae* 9 (4): 384-389.

Selwood A. I., Miles C. O., Wilkins A. L., van Ginkel R., Munday R., Rise F. and McNabb P. (2010). Isolation, Structural Determination and Acute Toxicity of Pinnatoxins E, F and G. *J. Agric. Food Chem.* 58 (10): 6532-6542.

2.2. Objectifs retenus pour l'étude

1. Recherche en CL-SM/SM des différents analogues de PnTX (PnTX-E, -F et -G) dans les échantillons de l'année 2011 en provenance d'Ingril.
2. Production d'un étalon caractérisé pour sa teneur en Pinnatoxine-G. Cette action comprend : la purification à partir de culture de microalgues, la caractérisation par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire), ainsi que la stabilité accélérée de la Pinnatoxine-G purifiée. Ce volet sera réalisé dans le cadre d'une sous-traitance avec le Conseil National de Recherche Scientifique canadien (CNRC).
3. En cas de développement de l'algue productrice de pinnatoxines, cerner sa répartition dans la colonne d'eau (gradient surface / fond), en vue de développer ultérieurement, si besoin, un protocole de prélèvement de(s) l'espèce(s) phytoplanctonique(s) responsable(s).
4. Isolement et mise en culture des souches françaises productrices de pinnatoxines (*Vulcanodinium rugosum*).
5. Étude de faisabilité et optimisation des paramètres de culture en masse de différentes souches productrices de pinnatoxines. La maîtrise de ces cultures en masse permettrait, ultérieurement, d'assurer une production d'étalon de ces toxines pour les laboratoires nationaux impliqués dans la surveillance, ainsi que pour les futures études toxicologiques nécessaires à la caractérisation du danger, et par conséquent à l'évaluation du risque. La mise en place de production d'étalon suffisant pour les études toxicologiques et ces études toxicologiques feront l'objet d'un nouveau projet.
6. Etude toxicologique de la pinnatoxine-G (étalon, extraits d'algues purifiés, tissus HP de coquillages contaminés). La cytotoxicité sera évaluée sur les modèles de toxicologie disponibles à l'Anses Fougères, notamment utilisant des cellules neuroblastomes et Caco2 (étalons et/ou extraits d'algues). L'évaluation de la toxicité in vivo sera approfondie par des tests sur le rat (par voie orale) par le laboratoire de toxicologie de l'université de Trieste (tissus HP et/ou extraits d'algues).

3) Suivi de *Vulcanodinium rugosum* à Ingril et mise en culture

3.1. Suivi de *Vulcanodinium rugosum* à Ingril

L'observation de *V. rugosum* dans les échantillons d'eau à Ingril s'est montrée plus difficile qu'anticipée. En premier lieu, le personnel sur place n'avait pas les clés d'identification pour la reconnaissance de l'organisme sous le microscope. Cette compétence a été acquise en début d'année 2012. Un suivi in situ a été mis en place à partir de mars. Les échantillons sont en cours de traitement. Les premiers résultats montrent une concentration faible de *Vulcanodinium rugosum* dans la colonne d'eau. En juillet et août 2012, l'organisme a été observé dans la colonne d'eau à Ingril à des concentrations relativement importantes (Tableau 1). La corrélation entre la température de l'eau et la concentration cellulaire n'est pas statistiquement significative (Figure 4), toutefois une tendance de corrélation positive semble discernable. Des études plus approfondies seront donc nécessaires afin de confirmer si cette tendance est avérée.

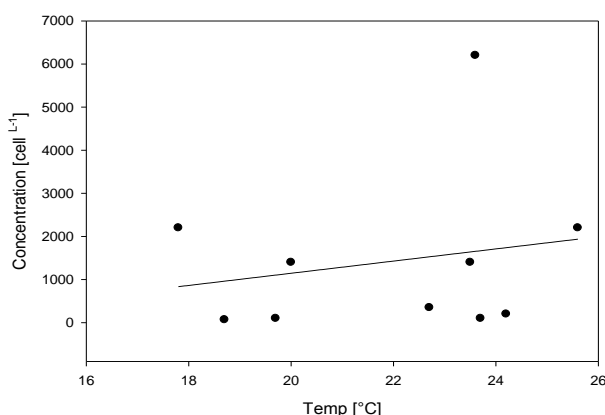


Figure 4. Relation entre *Vulcanodinium rugosum* dans la colonne d'eau à Ingril et la température de l'eau

Tableau 1. Comptage de cellules de *V. rugosum* dans l'eau de mer à Ingril

Date	Température [°C]	Cellule/L	Salinité
02/07/2012	22,7	350	36,4
09/07/2012	23,6	6200	37,3
16/07/2012	17,8	2200	39,4
23/07/2012	18,7	68	39,0
30/07/2012	20,0	1400	38,1
06/08/2012	23,5	1400	40,0
20/08/2012	25,6	2200	38,5
23/08/2012	23,7	100	39,9
04/09/2012	19,7	100	38,6
10/09/2012	24,2	200	37,8

3.2. Mise en culture d'autres souches de *Vulcanodinium rugosum*

Dû à la difficulté d'identification de l'organisme et faute de présence de cellules dans l'eau en concentration importante, peu d'échantillons ont pu être utilisés pour la mise en culture d'autres souches. Une dizaine d'échantillons ont été prélevés depuis le début de l'étude, et la moitié de ces prélèvements contient des cellules ressemblant à *V. rugosum* qui ont été mis en culture. La croissance est lente et il n'y a pas encore eu suffisamment de cellules pour permettre l'analyse chimique de ces échantillons.

4) Obtention d'un étalon caractérisé pour la Pinnatoxine G

Le rapport fourni par le sous-traitant (CNRC) est intégralement reproduit en annexe 1.

4.1 Préparation de l'étalon

La Pinnatoxine G (PnTX-G) a été isolée par des scientifiques en Nouvelle Zélande selon une procédure publiée (Selwood et al., 2010)¹.

Suite à la vérification de la pureté, une solution d'étalon a été préparée dans du méthanol avec 0.01 % acide acétique. La concentration de la PnTX-G a été analysée de manière gravimétrique et vérifiée par des techniques de RMN quantitative. Ensuite, la solution a été scellée en ampoules de verre ambré sous argon (atmosphère inerte) ; des portions de 0,5 et 2,5 mL ont été préparées pour faciliter la préparation d'étalon ou des études toxicologiques.

La concentration nominale de solution préparée est de 2,14 µg mL⁻¹ (3,08 µmoles L⁻¹).

4.2 Caractérisation de l'étalon

La pureté de la toxine a été vérifiée par analyse CL-SM et par analyse RMN (annexe 1). Aucune impureté significative n'a été détectée. L'identité du composé a été vérifiée par spectrométrie de masse (Figure 5).

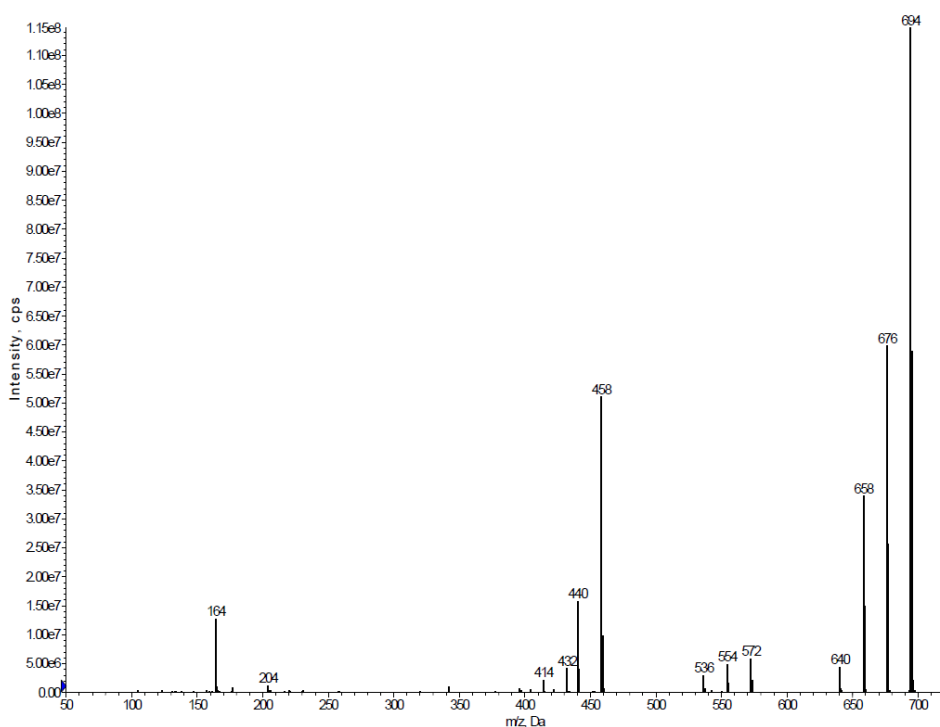


Figure 5. Spectre de masse confirmant l'identité de la pinnatoxine G (acquis sur 4000-Q-Trap)

¹ Selwood, A.I., Miles, C.O., Wilkins, A.L., van Ginkel, R., Munday, R., Rise, F., McNabb, P., 2010. Isolation, Structural Determination and Acute Toxicity of Pinnatoxins E, F and G. *J. Agric. Food Chem.* 58, 6532-6542.

La stabilité de la solution a été vérifiée de -20 à +40 °C, en prenant -80 °C comme température de référence. Aucune dégradation significative n'a été détectée sur une période de 14 jours pour toutes les températures étudiées (Figure 6).

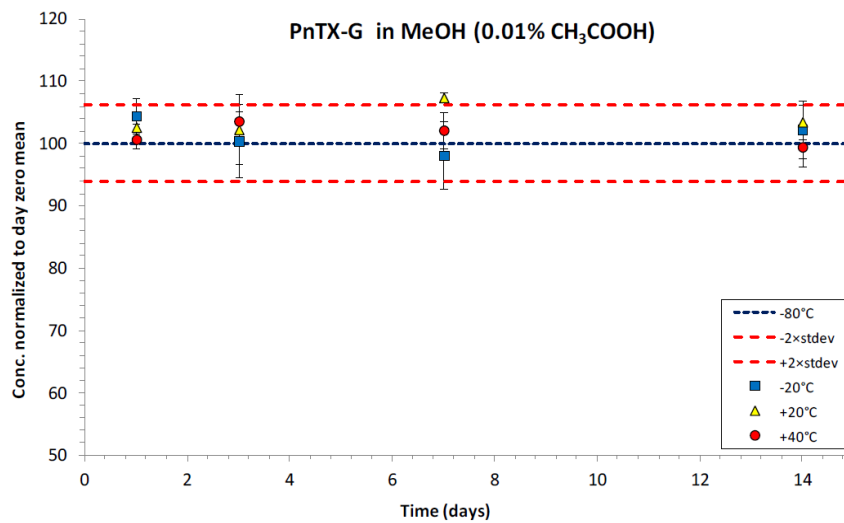


Figure 6. Stabilité de la pinnatoxine G en solution méthanolique (avec ajout de 0.01 % d'acide acétique) à -20, +20 et +40 °C.

Cette étude a donc vérifié l'aptitude de la solution préparée pour l'utilisation en tant que calibrant d'analyse CL-SM.

Cet étalon a été utilisé par la suite pour toutes les analyses Ifremer (à Nantes et à Sète) pour la quantification de la PnTX-G. Des facteurs de réponse de 1 ont été supposés pour l'analyse quantitative en spectrométrie de masse des autres analogues.

5) Suivi des Pinnatoxines dans les moules et palourdes à Ingril

5.1. Suivi des pinnatoxines dans les moules et palourdes à Ingril

Un total de 50 échantillons a été analysé pour les pinnatoxines en 2011, ainsi que 34 en 2012 (total de 84 échantillons). Le minimum de la PnTX-G mesuré en 2011 était de $13 \mu\text{g kg}^{-1}$ en novembre 2011 et le maximum était de $579 \mu\text{g kg}^{-1}$ en juin 2011. En 2012, le minimum ($17 \mu\text{g kg}^{-1}$) était mesuré en janvier, et le maximum de $631 \mu\text{g kg}^{-1}$ en juin. Le suivi dans le temps confirme la tendance observée de la présence des maxima cellulaires en période estivale (Figure 7).

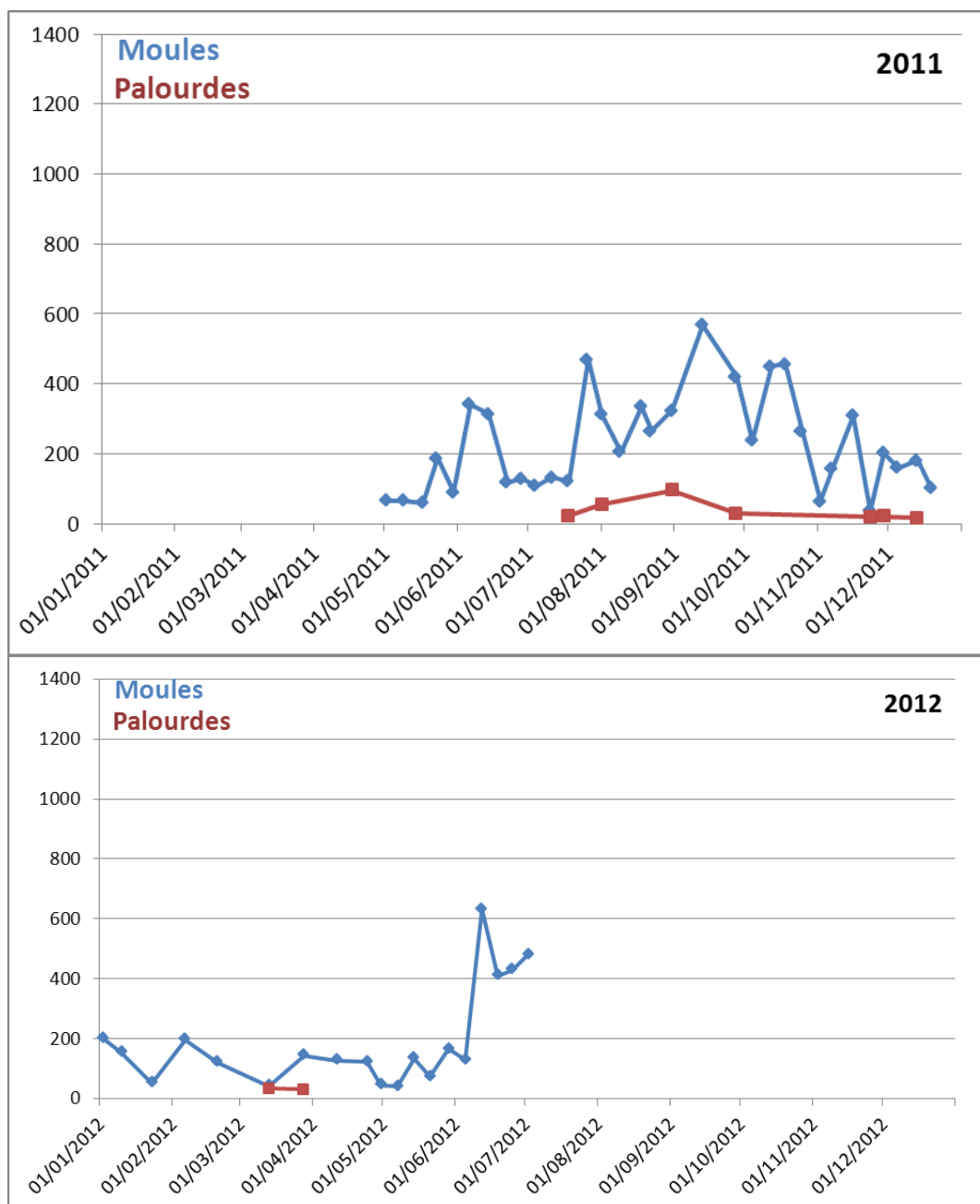


Figure 7. Evolution de la Pinnatoxine G dans les moules (chairs totales) à Ingril courant 2011 et 2012. Maxima observés de juin à octobre en 2011 et de juin à août en 2012 (concentration en ordonné en $\mu\text{g kg}^{-1}$). Nota bene : les valeurs maximales des axes ordonnés sont égales à ceux de la Figure 5 pour comparaison.

5.2. Comparaison rétrospective avec les échantillons de 2009 et 2010

L'analyse des échantillons de 2009 et de 2010 en utilisant le nouvel étalon fourni par le CNRC a permis de confirmer les analyses conduites fin 2010, données qui avaient incité la cellule de vigilance à suggérer la présente étude (Figure 8).

Cette étude confirme donc les résultats obtenus initialement avec un maximum observé en PnTX-G d'environ 1250 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

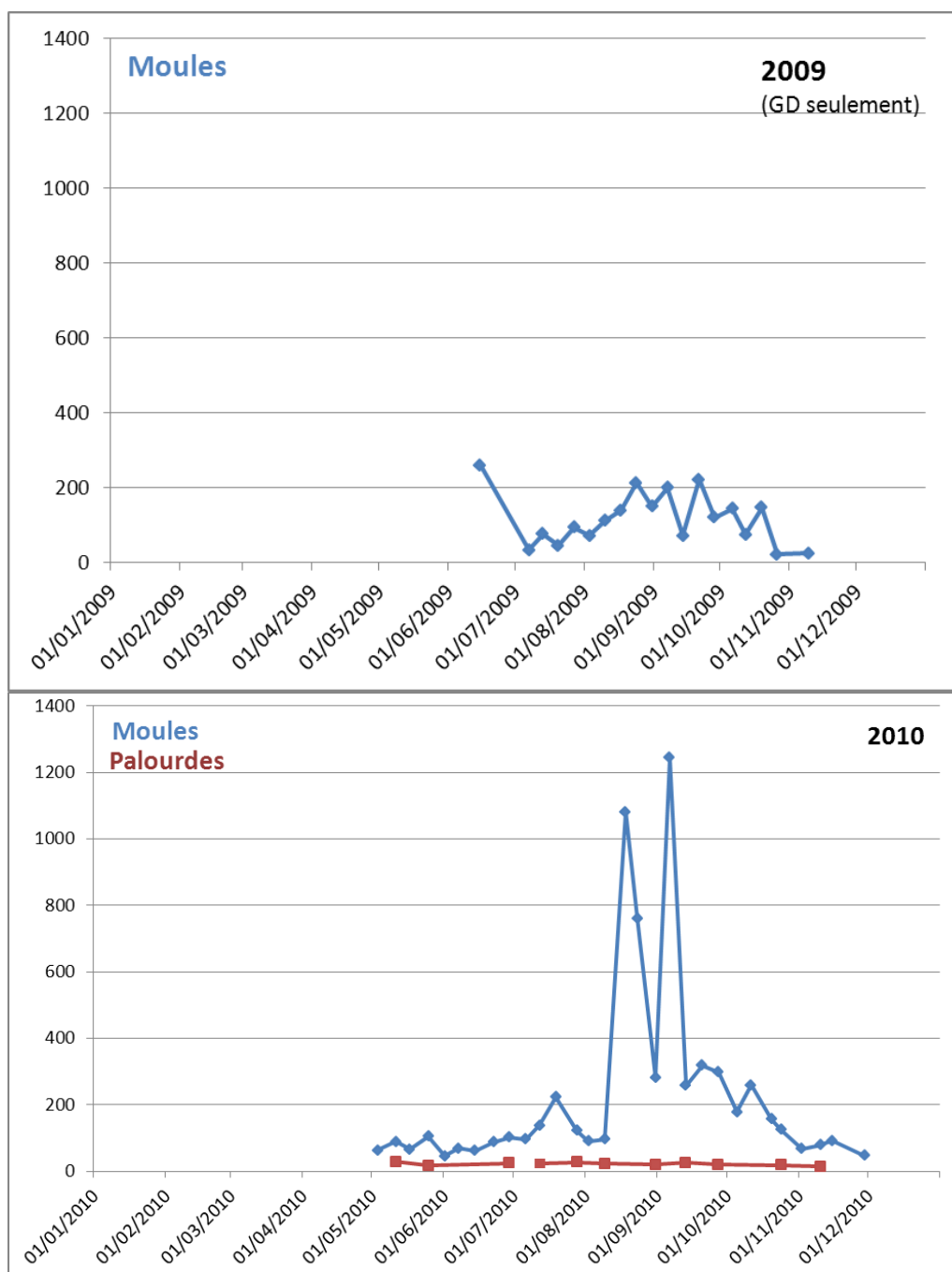


Figure 8. Evolution de la Pinnatoxine G dans les moules de l'étang d'Ingril (les résultats des analyses de glandes digestives prélevées en 2009 sont exprimés en chairs totales, par contre en 2010 les analyses sont réalisées sur les chairs totales). Maxima observés de juin à octobre en 2009 et d'août à octobre en 2010 (concentration en ordonnée en $\mu\text{g kg}^{-1}$). Nota bene : les valeurs maximales des axes ordonnés sont égales à ceux de la Figure 4 pour comparaison.

L'analyse de l'évolution de la PnTX-G dans les moules sur 4 années sur le même site (Ingril) montre qu'il peut y avoir une forte variabilité interannuelle, comme pour toutes les algues toxiques et leurs toxines. Néanmoins, nous notons que chaque année des concentrations $> 200 \mu\text{g kg}^{-1}$ ont été mesurées, et sur les trois dernières années des maxima entre 600 et $1250 \mu\text{g kg}^{-1}$ ont été mesurés. Ainsi, ce site présente les plus fortes valeurs rapportées au niveau mondial (autres rapports de Nouvelle Zélande, Norvège, Canada).

5.3. Comparaison entre moules et palourdes et relation entre PnTX-G et -A

Les résultats des neuf prélèvements pour lesquels il était possible de comparer les moules et les palourdes montrent qu'il y a une différence nette entre l'accumulation de la PnTX dans chacune des espèces de bivalves (Tableau 2). Bien que les deux espèces soient dans le même compartiment environnemental (sédiment sablo-vaseux), le ratio $\text{PnTX}_{\text{moule}}/\text{PnTX}_{\text{palourde}}$ peut monter jusqu'à 15. On note également que les plus forts ratios sont associés aux plus fortes concentrations, ce qui suggère que les moules sont plus rapides à accumuler la toxine. Ainsi ce ratio peut être considéré comme indicateur d'une toxicité entrante. L'observation confirme de nouveau le caractère indicateur des moules en tant qu'espèce sentinelle.

Tableau 2. Comparaisons des niveaux de contamination entre moules et palourdes, ainsi qu'entre les ratios des pinnatoxines G et A dans moules et dans les palourdes.

	PnTX-G palourdes	PnTX-G moules	ratio PnTX G moules/ palourdes	palourdes	moules
date prélèvement	$\mu\text{g/kg CT}$	$\mu\text{g/kg CT}$		Ratio PnTXA/PnTXG (%)	
18/07/2011	23	121	5	2,1	0,9
01/08/2011	55	459	8	2,2	0,8
31/08/2011	95	324	3	1,2	0,6
27/09/2011	28	421	15	2,0	0,5
23/11/2011	19	37	2	s/o	3,7
29/11/2011	21	202	10	s/o	0,8
13/12/2011	17	181	11	s/o	0,6
13/03/2012	35	43	1	s/o	s/o
28/03/2012	32	145	5	s/o	s/o
		moyenne	7	1,89	1,13
		CV (%)	68	25	100

La PnTX-A est un métabolite des coquillages de la PnTX-G². La teneur en PnTX-A peut varier entre « non détectable » jusqu'à environ 2%. La moyenne de ce pourcentage est légèrement plus élevée chez les palourdes que chez les moules, 1.9 et 1.1 % respectivement (tableau 2). Les PnTX-E et -F n'ont pas été détectées ni dans les moules ni dans les palourdes. L'absence de ces analogues est indicatrice des différences entre la situation à Ingril et en Nouvelle Zélande où les PnTX-E et -F sont observées fréquemment.

² Selwood, A.I., Miles, C.O., Wilkins, A.L., van Ginkel, R., Munday, R., Rise, F., McNabb, P., 2010. Isolation, Structural Determination and Acute Toxicity of Pinnatoxins E, F and G. *J. Agric. Food Chem.* 58, 6532-6542.

6) Faisabilité de la culture en masse de *Vulcanodinium rugosum*

La faisabilité d'une culture en masse de l'organisme a été testée grâce à l'aide d'un contrat CDD de 3 mois sur ce sujet. De plus, le laboratoire a aussi accueilli une stagiaire Master 1 sur un sujet voisin (l'étude des facteurs environnementaux affectant la croissance et production toxinique de *V. rugosum*). Ce stage a été financé sur fonds propres de l'Ifremer (hors convention).

La culture de *V. rugosum* a été testée essentiellement en batch du fait de sa forte adhérence aux surfaces des flacons de culture (Figure 9) et du faible nombre de cellules dans la colonne d'eau (milieu de culture). Après vérification de faisabilité d'un bullage, celui-ci est utilisé en routine.

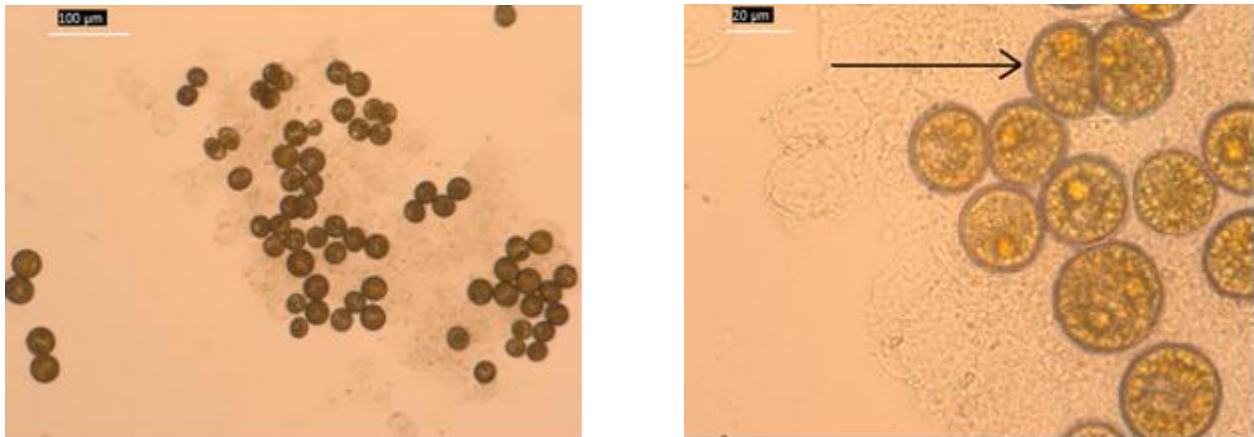


Figure 9. Images microscopiques des cellules adhérentes sur une surface de flacon de culture (gauche) et agrandissement x 40 montrant les muqueuses d'emplacement cellulaire sur la paroi.

Du fait de l'adhérence des cellules aux parois des contenants de culture, une méthode de comptage spécifique a dû être développée (annexe 3). Différents milieux ont été testés afin d'optimiser la croissance de ces organismes en culture (Figure 10).

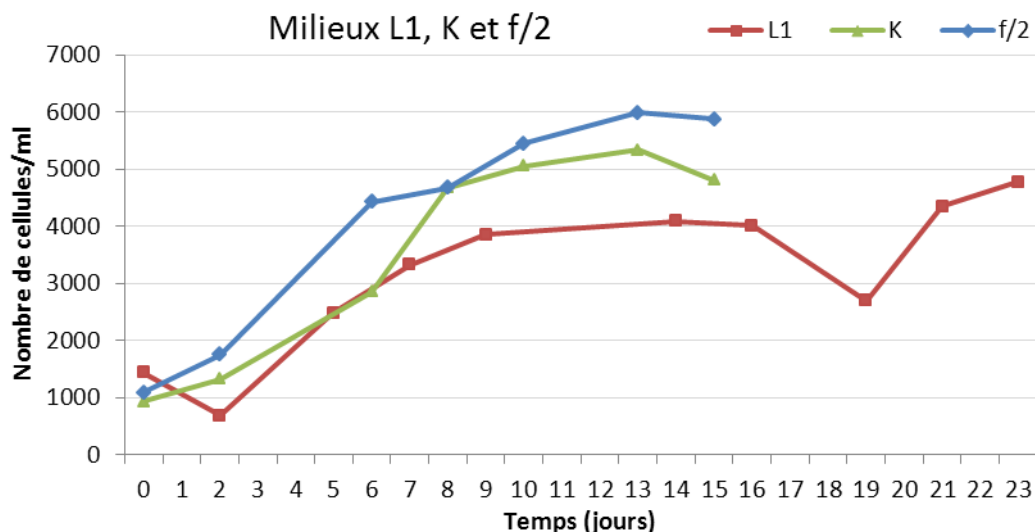


Figure 10. Courbes de croissances de *V. rugosum* dans différents milieux de culture (L1, K et f/2).

Ensuite, les sources d'azote ont été variées (nitrate et urée). Bien que les taux de croissance n'aient pas changé significativement en remplaçant le nitrate par l'urée, une légère augmentation des cellules dans la colonne d'eau a été observée. Vu les fortes salinités observées à Ingril (Tableau 1), l'influence de la salinité a été vérifiée entre 35 et 40‰, avec une préférence de l'organisme pour 40‰.

Les premières expériences au laboratoire sur l'influence de la température ne confirment pas de tendance entre 22 et 25 °C. Cependant, il faudrait approfondir ces observations en élargissant la gamme de température d'environ 18 à 29 °C.

Pour *V. rugosum*, un taux de croissance (μ_{moyen}) d'environ 0,13 division jour⁻¹ a été obtenu comme taux maximal pour les différentes conditions testées. Ce taux est comparable au taux de croissance d'*Ostréopsis ovata* (une autre microalgue benthique). Ce taux est aussi environ deux à quatre fois plus faible que le taux de croissance d'*Alexandrium minutum* et environ cinq fois plus faible que le taux de croissance d'*Azadinium spinosum*.

La faisabilité de production de masse algale à l'échelle pilote a donc été conduite en ballons de culture de 10 litres, Figure 11. La moitié d'une salle de culture a été dédiée à cette expérience sur environ 5 mois calendaires (novembre 2011 à mars 2012).



Figure 11. Cultures en batch (ballons de 10 L), à différents stades d'inoculum (volumes entre 3 et 8 L). Nota bene : les ballons du milieu gauche montrent les « anneaux » de dilution (les cellules s'accrochent toujours à la surface du ballon et à l'interface air/eau).

La production a été optimisée pour produire cinq à sept ballons par série dont quatre à six ont été récoltés à la fin de chaque série, et le dernier a été utilisé comme nouvel inoculum. Ainsi 10 séries ont été produites et récoltées (tableau 3). La première personne qui a travaillé sur le projet a produit les séries une à cinq et la deuxième personne (projet COLNACOQ) a récolté les séries six à dix, il y a donc des facteurs multiples qui interviennent dans la production toxinique. Néanmoins, la plus longue durée de culture résulte dans le plus faible rendement (2,7 $\mu\text{g g}^{-1}$ d'algue) ce qui suggère que la toxine est biodégradée en fin de culture. Un total d'environ 290 g de biomasse a été produit avec un total d'environ 3,1 mg de PnTX-G (en extrait brut). Ce rendement montre la difficulté des recherches sur les toxines de microalgues du compartiment benthique.

Si l'on compare cette production de 290 g de biomasse en 5 mois avec la production d'une microalgue adaptée au bioréacteur, p.ex. *Azadinium spinosum*, elle est environ deux à trois fois plus faible en biomasse produite par unité de temps³.

D'un autre côté, vu la rareté des toxines, et vu la nécessité d'avoir plus de composé pour les études toxicologiques, la procédure paraît adaptée pour produire des quantités de l'ordre du milligramme de toxine.

Tableau 3. Séries de production de *V. rugosum* (4 à 6 ballons récoltés), durée de culture, masse récoltée et montant et concentration de la PnTX-G obtenue. Nota bene : pour la durée la plus longue le rendement en PnTX-G est le plus faible.

Série	Récolte	Masse culot	PnTX-G / masse algale	Montant PnTX-G
	[j]	[g]	[µg/g]	[µg]
S1	41	26,6	23,1	614,5
S2	33	18,9	23,5	442,6
S3	29	16,1	18,8	303,6
S4	39	12,7	18,7	237,1
S5	25	15,9	16,3	259,5
S6	47	28,4	12,7	411,1
S7	37/73*	28,3	12,9	276,9
S8	63	57,9	2,5	140,4
S9	56	55,7	4,6	246,3
S10	43	29,1	6,3	181,8
*1 ballon gardé 73 jours		289,6 (somme)	13,9 (moyenne)	3114,0 (somme)

Les cultures plus âgées ont typiquement un moindre rendement en toxine ; ce fait pourrait être lié à un relargage de toxine dans le milieu en fin de culture. Une optimisation plus approfondie devrait également permettre de maximiser le rendement afin de rendre plus efficace d'éventuelles purifications et production d'étalon.

³ Jauffrais T., Kilcoyne J., Séchet V., Herrenknecht C., Truquet T., Bérard J.P., Taylor S., Nulty C., Tillmann U., Miles C.O., Hess P. (2012) Production and isolation of Azaspiracid-1 and -2 from *Azadinium spinosum* culture in pilot scale photobioreactors. *Mar. Drugs* 10 1360-1382.

7) Etude toxicologique de la Pinnatoxine G

L'étude avait pour objectif de clarifier la toxicité de la Pinnatoxine G au niveau cellulaire et au niveau *in vivo* (dans l'animal entier). Les études sur l'animal vivant ont été repoussées pour plusieurs raisons :

- a) La disponibilité de toxine est extrêmement limitée
- b) Une étude néozélandaise a été conduite durant notre étude
- c) Un avis nous a été transmis sur des approches à explorer

L'étude néozélandaise nous a été rapportée rapidement (avant même sa publication) et les résultats étant plutôt inquiétant nous nous sommes rapprochés de notre collaborateur / expert en toxicologie : Prof. Aurelia Tubaro. Les auteurs néozélandais ont exposé des souris à des doses de PnTX-G par voie orale pour établir la dose létale à laquelle 50 % des animaux meurent (DL_{50} orale) ainsi que la dose qui ne montre pas d'effet (NOAEL). L'étude suggère que les effets de la PnTX-G par voie orale soient plus importants (DL_{50} orale = $150 \mu\text{g kg}^{-1}$ chair de souris) que ceux de l'acide okadaïque (DL_{50} orale = 400 à $2000 \mu\text{g kg}^{-1}$ chair de souris)⁴. Prof. Tubaro nous a expliqué ses critiques des travaux néozélandais et de nos idées initiales (test oral sur rat avec point de détection la diarrhée) :

- a) La diarrhée comme indicateur d'effet n'a pas de sens toxicologique
- b) L'étude néozélandaise a des défauts méthodologiques qui affectent potentiellement
 - a. L'estimation de la DL_{50} Orale
 - b. L'estimation de la dose NOAEL

Les propositions résultantes de l'avis du Prof. Tubaro sont discutées en section 8) Perspectives.

Les résultats rapportés ici focalisent donc sur les études qui ont utilisés des modèles cellulaires.

7.1. Cytotoxicité de la pinnatoxine et de *Vulcanodinium rugosum*

Deux jeux de données ont été obtenus en matière de cytotoxicité, le premier par le biais du stage de Gwenaëlle Deslanglois à l'Anses Fougères (sous la direction de Valérie Fessard), et le second dans le cadre de l'étude COLNACOQ (financé par la région des Pays de la Loire, thésard Marie Geiger, sous la direction de François Pouchus et Philipp Hess). Le rapport de stage de Gwenaëlle Deslanglois est reproduit dans son intégralité dans l'annexe 4. A l'Anses, deux lignées de cellules ont été testées : les Caco2 (cancer du côlon) et les Neuro2a (neuroblastomes) ; à l'Université de Nantes, les cellules KB ont été testées (cancer de l'épiderme buccal). Ces trois lignées sont des cellules adhérentes.

La PnTX-G n'a pas montré de cytotoxicité (test MTT ou XTT) quel que soit le modèle cellulaire utilisé. Sur KB aucune inhibition de croissance n'a été détectée pour la PnTX-G pure jusqu'à 100 ng ml^{-1} . Pour le modèle des cellules Caco2 différenciées, aucune inhibition de croissance n'a été détectée jusqu'à 32 ng mL^{-1} . De même, sur le modèle des cellules Caco2 non-différenciées et les Neuro2a, aucun effet n'est détecté (Figure 12).

Cette absence de toxicité de la PnTX-G pure semble être en forte contradiction avec la forte cytotoxicité observée par l'extrait brut de l'algue *V. rugosum* (Figures 13 et 14).

⁴ EFSA (European Food Safety Authority), Marine biotoxins in shellfish – Okadaic Acid and analogues, Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain, adopted on 27 November 2007, EFSA Journal (2008) 589, 1-62.

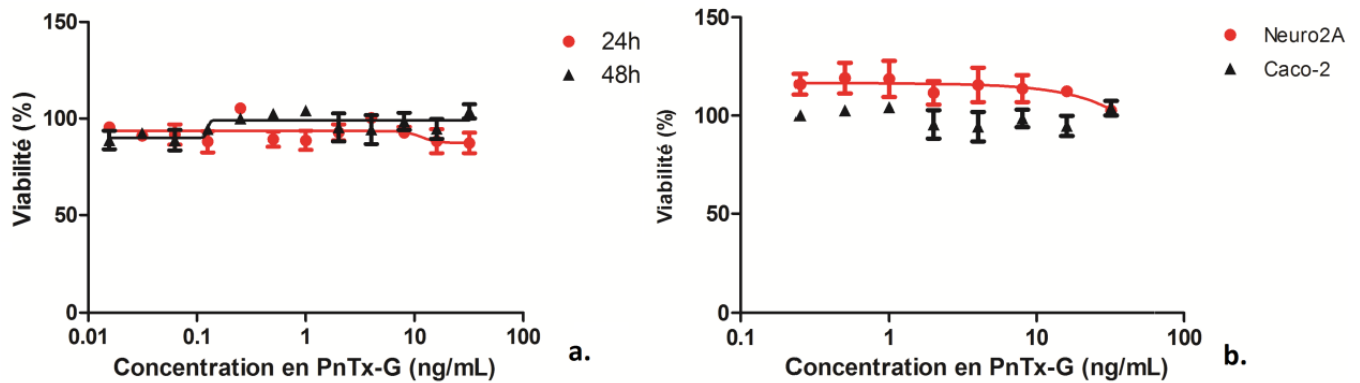


Figure 12. Comparaison des effets cytotoxiques de la PnTx-G pure (a.) sur Caco-2 non différenciées après 24h et 48h de traitement (b.) sur Caco-2 non différenciées et sur Neuro 2A après 24h de traitement. La viabilité cellulaire est estimée en pourcentage, 100% de viabilité correspondant au témoin (MeOH 5%). Les résultats sont obtenus à partir de deux expériences indépendantes. Les valeurs présentées sont les moyennes des résultats obtenus avec leurs écarts types.

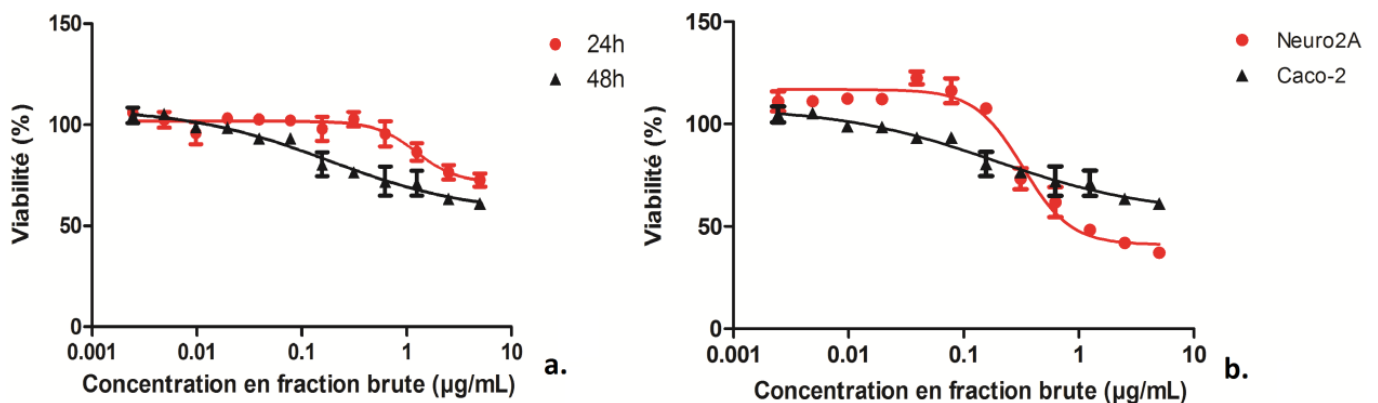


Figure 13. Comparaison des effets cytotoxiques de l'extrait brut de Vulcanodinium rugosum (a.) sur Caco-2 non différenciées après 24h et 48h de traitement (b.) sur Caco-2 non différenciées et sur Neuro2A après 24h de traitement. La viabilité cellulaire est estimée en pourcentage, 100% de viabilité correspondant au témoin (MeOH 5%). Les résultats sont obtenus à partir de deux expériences indépendantes. Les valeurs présentées sont les moyennes des résultats obtenus avec leurs écarts types.

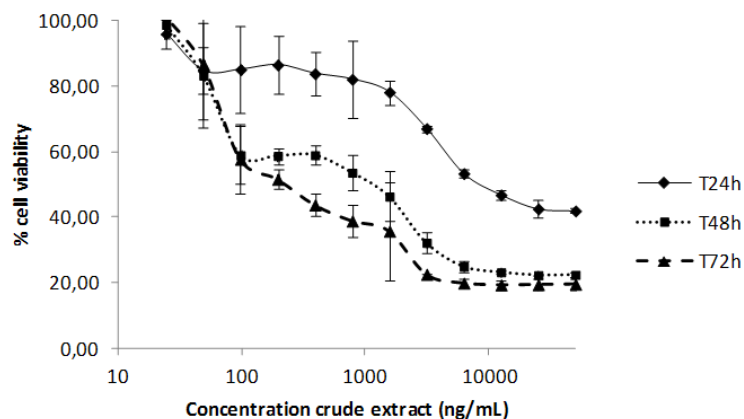


Figure 14. Comparaison des effets cytotoxiques de l'extrait brut de Vulcanodinium rugosum sur cellules KB différenciées après 24h, 48h et 72h de traitement.

Ce fort différentiel entre la toxicité de l'extrait brut et l'absence de toxicité de la PnTX-G pure sur les différents modèles cellulaires (modèles cohérents entre eux) nous a amené à étudier l'extrait brut de *V. rugosum* de manière plus approfondie (annexe 7). Cet approfondissement a été conduit dans le cadre du projet COLNACOQ et donc le temps agent utilisé ne vient pas de cette convention et l'étude n'est

mentionnée ici que parce qu'elle permet d'éclaircir l'aspect toxicité observée. Nous avons fractionné l'extrait brut à l'aide de différentes partitions de phase et d'une étape chromatographique. Deux des cinq fractions obtenues montrent une très forte cytotoxicité sur le modèle KB. L'analyse chimique de ces deux fractions révèle la présence potentielle de plusieurs composés cytotoxiques qui ont été identifiés au préalable dans des éponges collectées dans le milieu marin naturel. Ainsi, les effets cytotoxiques de l'extrait brut peuvent être attribués le plus probablement à ces composés.

7.2. Effet de la pinnatoxine et des extraits de *V. rugosum* sur la barrière intestinale

Les cellules Caco2 cultivées en monocouche sont utilisées fréquemment comme modèle pour l'absorption intestinale et l'intégrité de la barrière intestinale. Des plaques avec des « inserts » sont utilisées dans la mise en œuvre de cette technique (Figure 15). Le différentiel de potentiel entre le côté apical et basal de chaque puits est une mesure de l'intégrité de la barrière cellulaire (et donc intestinale puisque les cellules Caco2 différenciées présentent des caractéristiques proches des entérocytes).

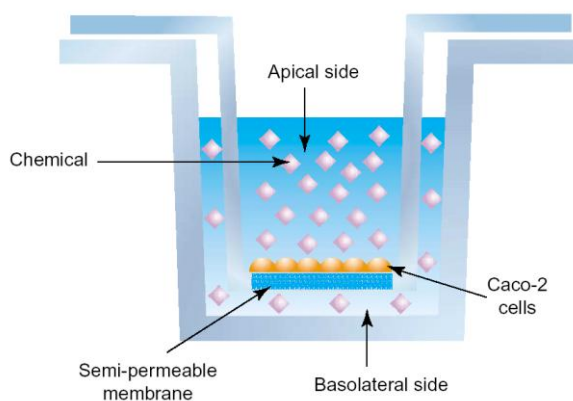


Figure 15. Modèle de cellules Caco2 différenciées cultivées en monocouche

Si la résistance électrique trans-épithéliale (TEER) diminue, le différentiel de potentiel diminue également, et la barrière est en dysfonctionnement. L'analyse de la PnTX-G pure montre qu'elle n'altère pas de manière significative l'intégrité de la monocouche cellulaire jusqu'à 24 h d'exposition et jusqu'à 32 ng mL⁻¹ tandis que l'extrait brut de *V. rugosum* n'a pas d'effet après 2 h d'exposition mais altère fortement la barrière cellulaire lorsque l'exposition est prolongée jusqu'à 24 h (Figure 16).

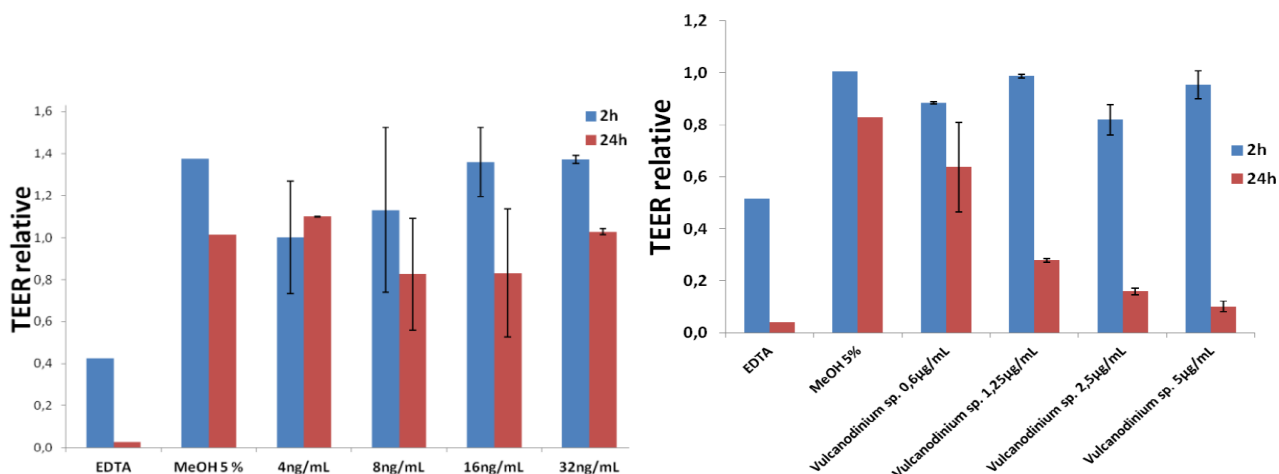


Figure 16. Effets de la PnTX-G pure (gauche) et de l'extrait brut de *V. rugosum* (droite) sur la résistance électrique trans-épithéliale (TEER) des cellules Caco2 différenciées cultivées en mono-couche. Nota bene : la toxine pure n'altère pas la TEER tandis que l'extrait brut a de forts effets après 24h.

Il est intéressant de noter que la PnTX-G traverse aisément la barrière cellulaire entre 2 et 24 h, sans aucune altération de l'intégrité de la monocouche (Figure 17).

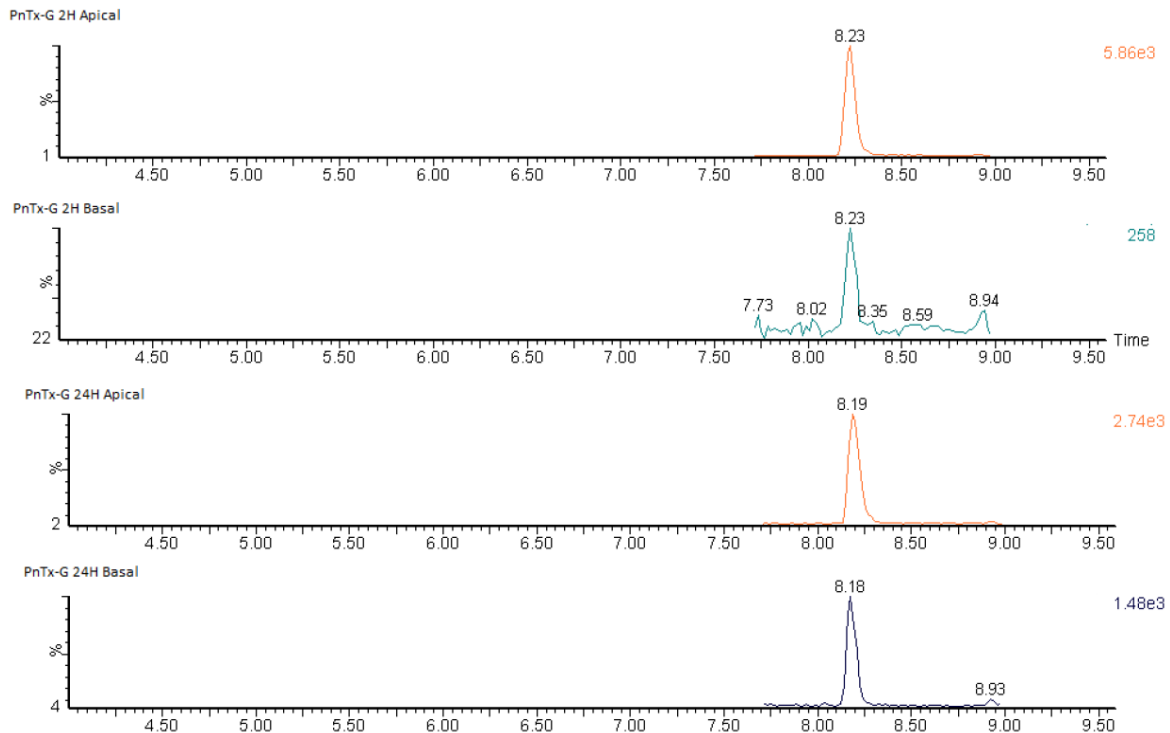


Figure 17. Transfert de la PnTX-G à travers la monocouche de cellules Caco2 différenciées. Après 2 h, il y a eu peu de transfert tandis qu'après 24 h, un certain équilibre entre les compartiments apical et basal est obtenu.

Cette observation est en cohérence avec le fait que Munday et al, 2012 (annexe 5) ont trouvé que la PnTX-G semblait être facilement absorbée après administration orale.

7.3. Autres effets de la PnTX-G et des extraits de *V. rugosum*

Contrairement à la PnTX-G pure, l'extrait brut de *V. rugosum* et les différentes fractions induisent des effets génotoxiques et affectent la prolifération cellulaire, même si ces effets sont observés à des degrés variables. Ainsi, la présence de ces différents constituants produits par l'organisme reste à vérifier différents constituants dont la présence dans les coquillages reste à vérifier ainsi que leur rôle dans la toxicité observée.

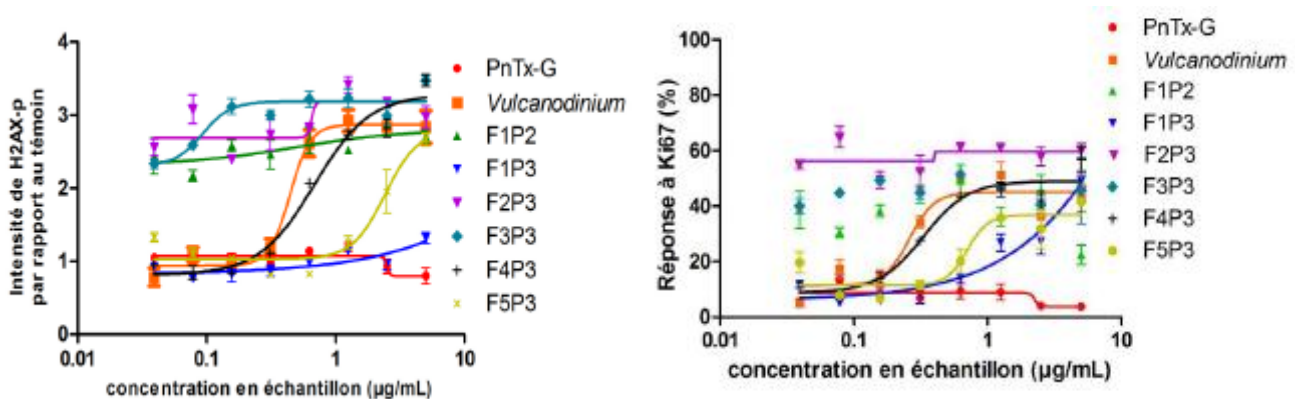


Figure 18. Gauche : comparaison des effets génotoxiques de la PnTx-G pure, de l'extrait brut de *V. rugosum* et de 6 fractions de *V. rugosum* sur Caco-2 non différenciées après 24h de traitement. Droite : Comparaison des effets sur la prolifération de la PnTx-G pure, de l'extrait brut de *V. rugosum* et des 6 fractions de *V. rugosum*, sur Caco-2 non différenciées après 24h de traitement.

8) Perspectives

8.1 Culture

La culture de *V. rugosum* a été conduite en mode batch et a pu être mise à l'échelle pilote afin de vérifier la faisabilité d'une culture en masse. Bien que la procédure reste chronophage, la production d'une biomasse nécessaire à la purification semble intéressante. La culture pourra être optimisée en batch et d'autres tentatives de mise en réacteurs pourront suivre en fonction des progrès sur la compréhension des facteurs environnementaux affectant la croissance, et surtout le passage de cet organisme de la phase non-mobile à la phase pélagique.

8.2 Suivi du milieu

Les agents du laboratoire Ifremer de Sète sont désormais formés à la reconnaissance de cet organisme. Il sera important de transférer cette capacité aux autres LER et de continuer le suivi dans d'autres zones méditerranéennes.

8.3 Production PnTX-G

La production d'un étalon de la PnTX-G a été faite en collaboration avec les néozélandais et le CNRC à Halifax. La production de l'organisme en culture facilitera cette démarche et pourra assurer un suivi durable si la toxicologie le prouve nécessaire.

8.4 Toxicologie

Les données sur la toxicité cellulaire de la présente étude et les données de toxicologie dans le modèle animal de Munday et al., 2012, suggèrent une forte toxicité du composé. Ceci est d'autant plus inquiétant que la toxicité *in vivo* par voie orale serait plus importante que celle de l'acide okadaïque. Il reste néanmoins des questions quant à la toxicité par voie orale car, dans l'étude de Munday et al., plusieurs techniques « non-traditionnelles » en toxicologie animale ont été utilisées, telle que le fort pourcentage en éthanol comme véhicule d'administration de la toxine. L'étude préliminaire de passage de la barrière intestinale devrait être poursuivie pour affiner les résultats. Ainsi, d'autres études sont nécessaires pour pouvoir procéder à une évaluation du risque à proprement parler.

8.5 Epidémiologie

Jusque-là, les données épidémiologiques proviennent uniquement des zones autour d'Ingril. Les agents du LER-LR ont constaté qu'il ne semble pas y avoir de récolte de moules pour consommation humaine dans l'étang d'Ingril, les quantités disponibles étant trop faibles. Cette coïncidence n'est pas anodine car elle peut expliquer pourquoi il n'y a pas encore eu de signal épidémiologique malgré la toxicité évidente du composé en question.

Annexe 1 : Rapport du CNRC – Halifax sur a caractérisation de l'étalon

NRC-CNRC

From **Discovery**
to **Innovation...**

Science
at work for
Canada

National Research Council Canada

**Preparation of a Pinnatoxin-G (PnTX-G)
Calibrant Reference Material**

Intermediate Report

Protected B

Submitted to: **Institut Francais de Recherche Pour
L'Exploration de la Mer (IFREMER)**
Rue de l'ile Yeu, Nantes, France, 44311

Submitted by: **Pearse McCarron, Sabrina Giddings and
Michael Quilliam**
NRC Institute for Marine Biosciences

October 6, 2011



National Research
Council Canada

Conseil national
de recherches Canada

Canada

A. Introduction and overview

Pinnatoxins (PnTXs) are a group of cyclic imine toxins first detected in Japanese shellfish [1-3]. Recently a number of new PnTX analogs have been identified in shellfish from New Zealand and Australia [4]. PnTXs have now been reported in Europe in Norwegian mussels [5] and in French shellfish harvesting areas (personal communication: P. Hess, IFREMER, France). Although, at this time, no toxic events have been directly linked to this group of toxins, they are receiving increased attention among the scientific community and are of interest because of their increased oral toxicity when compared to other cyclic imine toxins such as spirolides [5]. Currently no regulations are in place regarding levels of PnTXs in shellfish for human consumption.

Due to increased monitoring of shellfish for PnTXs, a collaborative research agreement (CRA) was initiated between the Institute for Marine Biosciences and IFREMER on the Preparation of Pinnatoxin Calibration Solutions. This report describes the preparation of a PnTX-G calibrant for supply to IFREMER for use in shellfish surveying. Details on purity of toxin, concentration of the reference material (RM) and stability are provided.

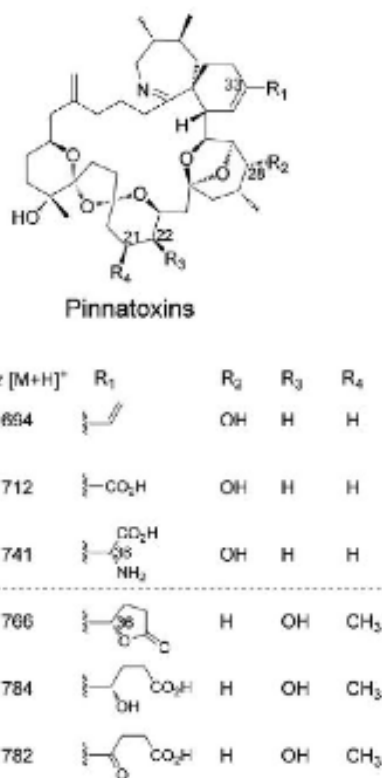


Figure 1. Structures of selected Pinnatoxin analogs (Miles *et al.* [5])

B. Materials and methods

1. Purity analysis of PnTX-G stock material:

PnTX-G was isolated by researchers at Cawthron Institute in New Zealand according to published procedures [4]. As part of the CRA, 5 mg of this material was purchased from Cawthron for production of a PnTX-G calibration solution. Purity analysis of the supplied PnTX-G was assessed by NMR and LC-MS prior to preparation of the calibration solution RM.

2. Preparation of RM-PnTX-G calibration solution:

Following purity assessment a PnTX-G solution was prepared in degassed CH₃OH containing 0.01% acetic acid. The PnTX-G concentration was determined by qNMR and also by gravimetric analysis of the supplied toxin. RM-PnTX-G was flame-sealed as 0.5 mL and 2.5 mL aliquots in argon purged amber glass ampoules.

3. Stability study:

To demonstrate the stability of PnTX-G in the selected solvent a short-term reverse isochronous stability study was performed. Stability was monitored at -20°C, +20°C and +40°C, using -80°C as the reference conditions. Samples were analyzed at 14, 7, 3 and 1 day time points.

All samples were analysed under repeatability conditions by LC-MS on an Agilent 1200 LC system (Palo Alto, CA, USA) connected to a QTRAP 4000 MS (AB Sciex, Concord, ON, Canada). The method used a Hypersil Gold C18 column (1.9 µm, 2.1 × 50 mm) (Thermo Scientific, Mississauga, Ontario, Canada). A binary mobile phase of water (A) and MeCN (B) each containing 50 mM formic acid and 2 mM ammonium formate was used, with a gradient running from 25 to 100% B over 3 min at 300 µL/min. The column was maintained at 20°C and an injection volume of 2 µL was used. The MS was operated in selective reaction monitoring mode.

C. Results

1. Purity analysis and structure confirmation

The purity of the PnTX-G material obtained for preparation of the calibrant was assessed by NMR and LC-MS. No significant impurities were detected by NMR and LC-MS analysis and the material was deemed adequate for production of a calibrant RM. The NMR also confirmed the identity of the toxin and an enhanced product ion spectrum acquired on the stock solution was characteristic of PnTX-G (Figure 2).

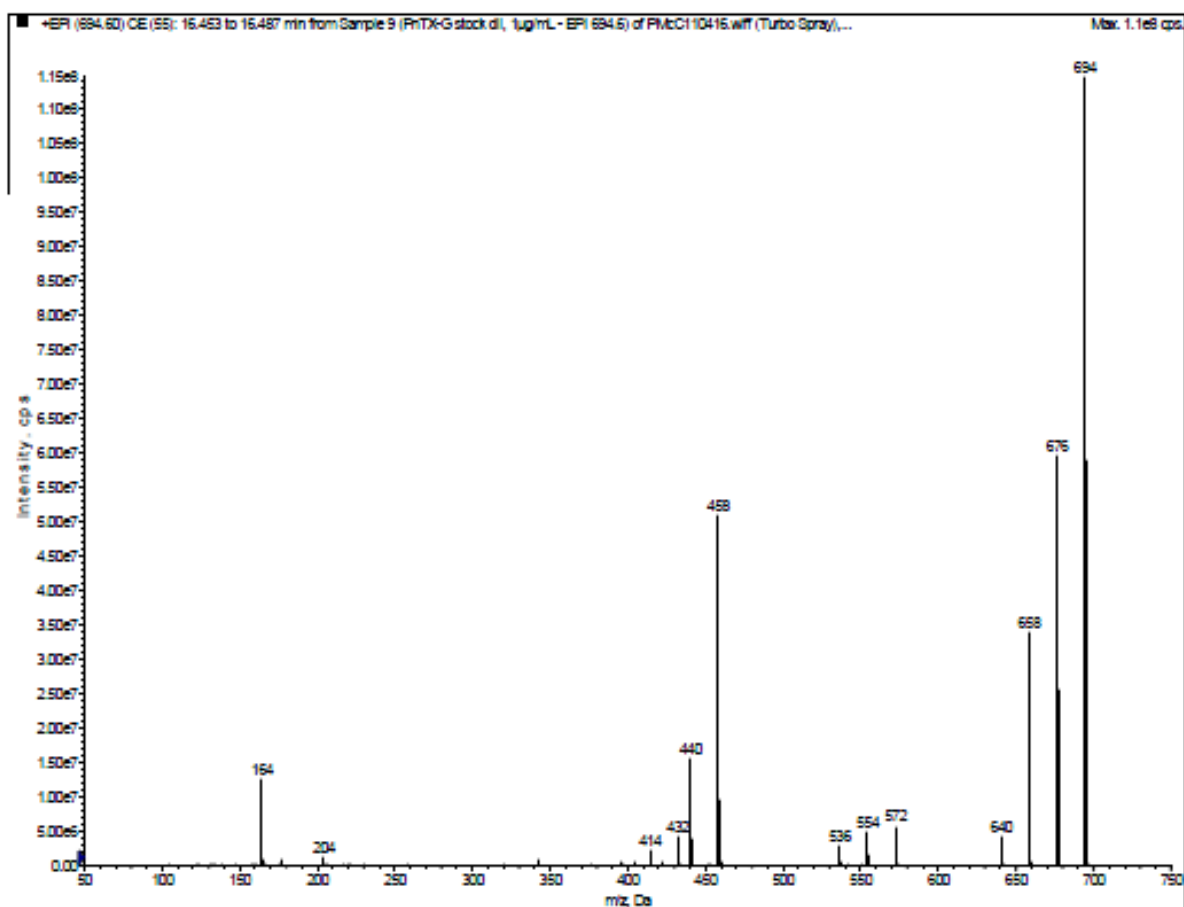


Figure 2. Enhanced product ion spectrum of PnTX-G stock solution.

2. Nominal concentration of RM-PnTX-G:

Based on gravimetric measurements, a nominal concentration for RM-PnTX-G is 2.14 $\mu\text{g/mL}$ (3.08 $\mu\text{moles/L}$). The value that has been determined by qNMR is slightly less, which would be expected if some water of hydration was present. Studies are ongoing to assign an accurate concentration to RM-PnTX-G based on at least one other analytical technique that is currently under development. Once all the measurements are completed, a value will be assigned.

3. Stability:

PnTX-G displays excellent stability when stored in MeOH containing 0.01% acetic acid. The analyte was stable over a 14 day period at temperatures up to +40°C (Figure 3).

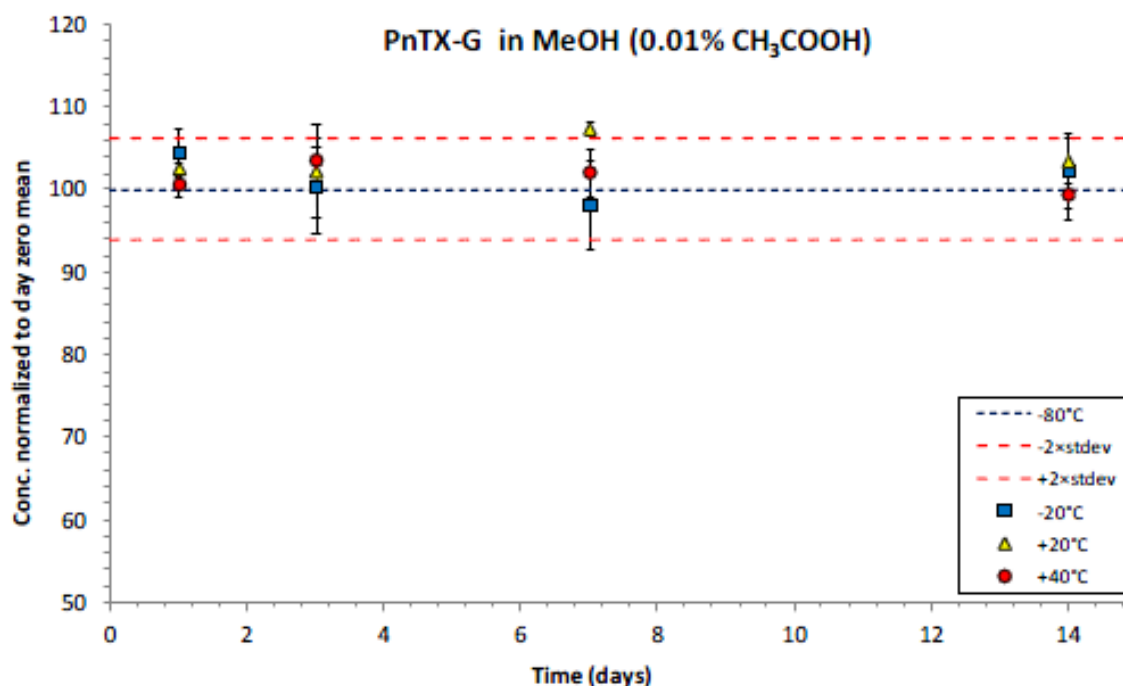


Figure 3. Short-term stability results for PnTX-G stored in MeOH with 0.01% CH₃COOH. Error bars represent ± standard deviation for replicate ($n=3$) injections of samples.

D. Shipment to IFREMER

On the 27th of April 2011 a chilled shipment was sent to IFREMER containing 50 × 0.5 mL and 21 × 2.5 mL ampoules of RM-PnTX-G. The material was received in a good state.

E. Ongoing work

Work is continuing at NRC-IMB on the production of a PnTX-G certified reference material for international distribution by NRC's Certified Reference Material Program. Stocks of PnTX-E and PnTX-F have been obtained by NRC-IMB from Cawthron and feasibility studies are ongoing for the production of RMs for these compounds.

F. References

- [1] D. Uemura, T. Chou, T. Haino, A. Nagatsu, S. Fukuzawa, S. Zheng, H. Chen, *Journal of the American Chemical Society* 117 (1995) 1155.
- [2] T. Chou, T. Haino, M. Kuramoto, D. Uemura, *Tetrahedron Lett* 37 (1996) 4027.
- [3] N. Takada, N. Umemura, K. Suenaga, T. Chou, A. Nagatsu, T. Haino, K. Yamada, D. Uemura, *Tetrahedron Lett* 42 (2001) 3491.
- [4] A.I. Selwood, C.O. Miles, A.L. Wilkins, R. van Ginkel, R. Munday, F. Rise, P. McNabb, *J Agric Food Chem* 58 (2010) 6532.
- [5] C.O. Miles, T. Rundberget, M. Sandvik, J.A.B. Aasen, A. Selwood, NVI report series 7b-2010, National Veterinary Institute, Oslo, Norway (2010).
<http://www.vetinst.no/eng/content/download/5105/57613/file/Report_series_10-07b_Pin_natoxins_in_Norwegian_mussels.pdf> (accessed 30.09.10.).

Annexe 2 : Rapport du CDD culture en masse (Ifremer)



Rapport d'activité
Février 2012

**VULCANODINIUM RUGOSUM : CULTURE DE MASSE,
RECOLTE ET EXTRACTION DE LA PINNATOXINE G**

Par Evan LE ROY

Encadré par
SEICHET Véronique
et
HESS Philipp



Sommaire

<u>I.</u>	<u>DESCRIPTION DE L'ORGANISME.....</u>	<u>4</u>
<u>II.</u>	<u>METHODE</u>	<u>5</u>
1)	Culture	5
2)	Récolte.....	6
3)	extraction de la pinnatoxine g et analyse au spectrophotomètre de masse	6
4)	Observations microscopiques	7
<u>III.</u>	<u>RESULTATS ET DISCUSSION</u>	<u>7</u>
1)	age de la récolte	7
2)	Technique de repiquage	8
3)	Technique de culture	9
4)	Observations microscopiques	12
<u>IV.</u>	<u>CONCLUSION</u>	<u>14</u>

Introduction

En 1990, une nouvelle substance toxique est découverte à partir du mollusque bivalve *Pinna attenuata*. Ce nouveau composé est alors appelé « pinnatoxine » (Selwood et al, 2010). Plus tard, la pinnatoxine A est isolée au Japon à partir du crustacé *Pinna muricata* en 1995. Les autres pinnatoxines B, C et D ont été isolées à partir de la même espèce de 1996 à 2001 au Japon également. (Shane et al, 2011). Les pinnatoxines E et F ont ensuite été découvertes en 2007 et 2008 en Nouvelle Zélande dans le port de Rangaunu. Ces même pinnatoxines ont également été isolées au sud de l'Australie en même temps que la pinnatoxine G (Rhodes et al, 2010 ; Smith et al, 2011).

C'est en février 2009 que l'organisme responsable de la production de pinnatoxine est décelé sous forme de kyste à partir d'un prélèvement à la surface du sédiment dans le port de Rangaunu en Nouvelle Zélande. (Rhodes et al (b), 2011). Identifié comme étant un dinoflagellé de l'ordre des péridiniales, sa culture est testée pour déterminer sa morphologie et sa taxinomie.

En 1996 et en 2001, le REPHY mettait en évidence la présence d'un nouveau dinoflagellé à thèque à partir d'échantillons prélevés en Méditerranée. Cependant, la trop faible concentration cellulaire n'avait pas permis une étude précise de sa morphologie. Mais il est retrouvé en 2009 en plus forte concentration ce qui a permis un isolement de la souche, une analyse précise de sa morphologie, et des tests de toxicité sur des souris à partir d'extrait de moules. Ces dernières ont alors présenté des troubles neurologiques. Il a été classé dans l'ordre des péridiniales. Cependant, ne pouvant être rattaché ni à une famille, ni à un genre connu, ce nouveau dinoflagellé est appelé *Vulcanodinium rugosum*. (Nézan, Chomérat, 2010)

Sera exposée dans ce rapport une rapide description de *Vulcanodinium rugosum*. La culture de masse, la récolte et les analyses de toxicité au spectrophotomètre de masse qui ont été réalisées seront ensuite présentées.

I. DESCRIPTION DE L'ORGANISME

Vulcanodinium rugosum est un dinoflagellé à thèque pouvant se présenter sous forme de cellules non mobiles mesurant 31 μm de diamètre ou de cellules non-mobiles mesurant 28 μm de long et 25 μm de large (Rhodes et al, 2010). Il peut être retrouvé en amas grâce à la formation d'une matrice muqueuse ou en cellules isolées. (Nézan, Chomérat, 2010)

Dans une culture de masse, la forme enkystée reste prédominante dans des températures inférieures à 20°C ou supérieure à 30°C. En revanche, la croissance optimale des cellules mobiles est atteinte à 25°C même si la formation de kystes reste très forte.

Suite à la division de kystes, un développement d'autres kystes et de cellules mobiles sont observées. (Rhodes et al, 2011(a))

La culture de *Vulcanodinium rugosum* a été testée dans plusieurs milieux et a donné des résultats différents :

- Le milieu L1 a donné le meilleur taux de croissance des cellules
- Le milieu K a abouti à une plus forte production de pinnatoxines E et F mais une moins bonne croissance
- L'urée comme source de croissance a donné 10% de kystes et 90% de cellules mobiles. Cette proportion est généralement inversée avec le nitrate comme source d'azote.

(Rhodes et al, 2010)

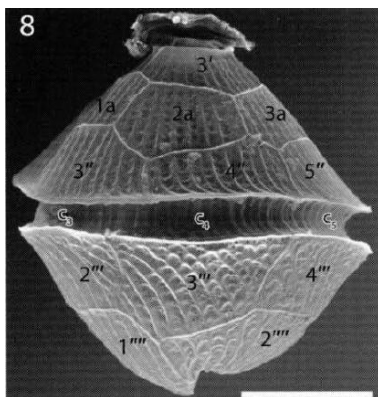


Photo 1 : Observation d'une cellule mobile de *Vulcanodinium rugosum* au microscope électronique à Balayage (échelle : 10 μm)

(NEZAN, CHOMERAT, 2010)

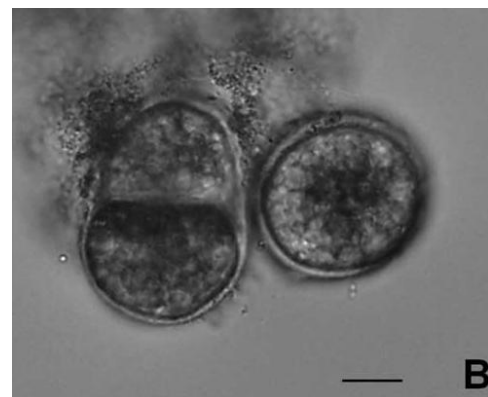


Photo 2 : Observation de cellules non mobiles (échelle : 10 μm)

(Rhodes et al, 2011 (a))

II. METHODE

1) CULTURE

La culture de masse de *Vulcanodinium rugosum* est effectuée par série de 5 ballons de 10 litres. Les ballons de cultures étaient placés sur des étagères dans une salle à température ambiante de 22°C.

L'objectif était de maintenir une production de 5 ballons repiqués par semaine. Cependant, il n'a pas toujours été possible de maintenir ce rythme en raison de la place disponible sur les étagères et du temps de culture variable entre les séries.



Photo 3: Cultures de masse de *Vulcanodinium rugosum* dans les ballons de 10 l

La série est repiquée grâce à un ballon de la série précédente. Le milieu L1 était utilisé pour la culture. Le repiquage était généralement effectué dans un volume final de 3 à 4 l. Deux dilutions étaient ensuite effectuées à 7 l au bout de 10 à 15 jours, puis à 10 l au bout de 20-25 jours.

Différentes méthodes de repiquage ont été testées :

- Repiquage avec des inocula de 100 ml (J 30) pour 2 L de milieu
- Repiquage avec 1 l du ballon précédent et remise en suspension des cellules fixées à la paroi par bullage (air filtré à 2 µm) dans tout le surnageant
- Repiquage avec 2 l du ballon de la série précédente :
 - o Repiquage avec 2 l de surnageant du ballon précédent
 - o Repiquage avec les 2 derniers litres du ballon et décrochage des cellules fixées à la paroi avec des billes

La culture de *V. rugosum* a aussi été testée dans des conditions de culture différentes :

- Sources d'azote différentes :
 - o Azote inorganique (nitrates) : 1,5 ml/l de nitrate à 75 g/l
 - o Azote organique (urée) : 1 ml/l d'urée à 3 g/l
- Culture avec bullage : l'air est filtré à 0,2 µm à son entrée et à la sortie du ballon

Ces conditions de cultures ont été testées afin de pouvoir comparer la quantité de cellules contenue dans le surnageant.

Un comptage au compteur à particule a donc été réalisé tous les 10 jours afin de connaître le nombre de cellules par millilitre.

Le récapitulatif des cultures est en **annexe 1**.

2) RECOLTE

Les récoltes étaient effectuées environ 30 jours après repiquage. Cependant, cette étape a parfois été retardée en fonction de l'avancement de la culture. La récolte s'appliquait sur 4 ballons pour une série (le 5^e ballon de la série servait au repiquage de la prochaine série).

La récolte s'effectuait par centrifugation. Les cellules fixées à la paroi étaient décrochées de façon mécanique à l'aide de billes. Le protocole précis de la récolte est en **annexe 2**.

Une autre méthode de récolte a été appliquée sur deux séries de ballons de 10 l :

- Récolte du surnagent : cellules des 9 premiers litres du surnagent
- Récolte du culot : le dernier litre contenant les cellules fixées à la paroi décrochées à l'aide de billes

Cette technique a été effectuée pour connaître la proportion de cellules contenue dans le surnagent.

3) EXTRACTION DE LA PINNATOXINE G ET ANALYSE AU SPECTROPHOTOMETRE DE MASSE

Ne disposant que de la gamme d'étalonnage de la pinnatoxine G, seule cette dernière a pu être identifiée et quantifiée. Les concentrations des pinnatoxines E et F n'ont donc pas pu être étudiées. Le protocole de récolte pour les tests est en **annexe 3**.

Les extractions de toxine étaient effectuées pour connaître la concentration de pinnatoxine dans certains échantillons d'algues en fonction des techniques de culture ou de récoltes :

- Analyse en fonction de l'âge de la culture à la récolte :
 - o Récolte à J70
 - o Récolte à J40
 - o Récolte à J30L'échantillon de la récolte à J70 présentait un aspect plus aqueux que les deux autres. En effet, il a été récolté par une autre personne qui a dû suivre un autre protocole de récolte. Il a donc été centrifugé pour tenter de retirer l'eau de l'échantillon.
- Analyse en fonction de la technique de récolte et à des âges différents :
 - o Récolte du surnagent des ballons
 - o Récolte du culot des ballons
- Analyse en fonction de la méthode de culture :
 - o Milieu avec l'urée comme source d'azote
 - o Milieu avec le nitrate comme source d'azote
 - o Milieu avec bullage et nitrates

Ces analyses ont été effectuées à partir de 50 ml de surnagent de chaque ballon. Un comptage au compteur à particules était appliqué après avoir ajouté de l'acide chloridrique (Dilution : 1/200) en parallèle pour connaître la quantité de pinnatoxine G produite par cellules.

Une observation dans un Kiel de 10 ml au microscope optique inversé a également été réalisée pour obtenir une estimation de la proportion de cellules mobiles et non mobiles.

4) OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES

Des photos au microscope optique ont été réalisées pour observer les différentes formes sous lesquelles peut apparaître *Vulcanodinium rugosum* dans le milieu de culture.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

La masse algale totale récoltée sur 24 ballons pendant les 3 mois de travail monte à 105 g. La moyenne de masse algale récoltée par ballon est donc d'environ 4.4 grammes. Cependant, si on prend en compte les 3 séries qu'il reste à récolter, cette masse totale pourrait monter à près de 150 g.

La proportion moyenne de cellules contenue dans le surnageant se situe à 29% par rapport aux cellules contenues dans le fond et sur les parois des ballons.

La concentration moyenne de pinnatoxines de toutes les séries est de 20 µg/g algue. La quantité de pinnatoxine G à partir des 7 séries récoltées pouvant être extraite peut alors être estimée à 2100 µg.

1) AGE DE LA RECOLTE

Âge	Quantité de pinnatoxine (µg) / g algues
J 70	18,30
J 41 42	23,08
J 34 35	23,45

La quantité de pinnatoxine G dans l'échantillon de J 70 présente un résultat légèrement plus bas que les deux autres échantillons. En revanche, les récoltes à J 41-42 et J 34-35 donnent une quantité de pinnatoxine G similaire.

Discussion

La quantité de pinnatoxine G reste la même quel que soit l'âge de la culture. Il semble donc que la production de toxine n'augmente pas en fonction du temps passé en culture, au moins à partir de J34. La plus faible quantité de toxine à J70 pourrait s'expliquer par la réalisation d'un protocole différent de culture ou de récolte. En effet, ces manipulations ont été réalisées par un autre employé et la masse algale semblait moins sèche que celles de J 41 et J 34.

2) TECHNIQUE DE REPIQUAGE

- Comparaison des récoltes par rapport à la quantité de culture pour le repiquage :

La série repiquée avec 100 ml d'inoculum a eu du mal à démarrer et la récolte a dû être retardée donnant 12,714 g de masse algale au bout de 40 jours.

La série repiquée avec 1 l de milieu de la culture précédente et récoltée au bout de 30 jours a abouti à une récolte de 15,344 g de masse algale.

- Comparaison de la proportion de cellules dans le surnagent et le culot :

	Ballon 1		Ballon 2		Ballon 3		Ballon 4	
	Culot	Surnagent	Culot	Surnagent	Culot	Surnagent	Culot	Surnagent
	0,78	5,281	0,806	2,745	0,631	2,362	0,61	2,694
Masse totale d'algue récoltée	6,061		3,551		2,993		3,304	
Pourcentage de cellules dans le surnagent	15%		29%		29%		23%	

La récolte du ballon 1 repiqué avec les 2 l du fond du ballon a donné 6,061 g avec 0,78 g dans le surnagent et 5,281 dans le culot, soit 15% de cellules dans le surnagent.

Le repiquage avec 2 l de surnagent a donné une moyenne de récolte de 3,28 g sur 3 ballons pour une moyenne de 0,682 g dans le surnagent et de 2,6 g dans le culot. La proportion de cellules contenues dans le surnagent représente environ 27%.

- Analyse de la quantité de pinnatoxine G du surnagent et du culot des ballons :

Âge	Echantillon	Quantité de pinnatoxine (µg) / g algues
J25	Surnagent	16,02
	Culot	16,59
J40	Surnagent	17,87
	Culot	19,54

Les quantités de pinnatoxines G (µg) par gramme d'algues sont présentées dans ce tableau. Les quantités du surnagent et du culot de ballon obtenues suite à une récolte à J 25 et J 40 peuvent être comparées. On observe que la quantité de pinnatoxines contenue dans le surnagent et le culot ne diffère pas entre elles, quel que soit l'âge de la culture.

Cependant, la quantité de pinnatoxine G semble légèrement supérieure dans les cellules contenues dans le culot par rapport à celles du surnagent.

Discussion

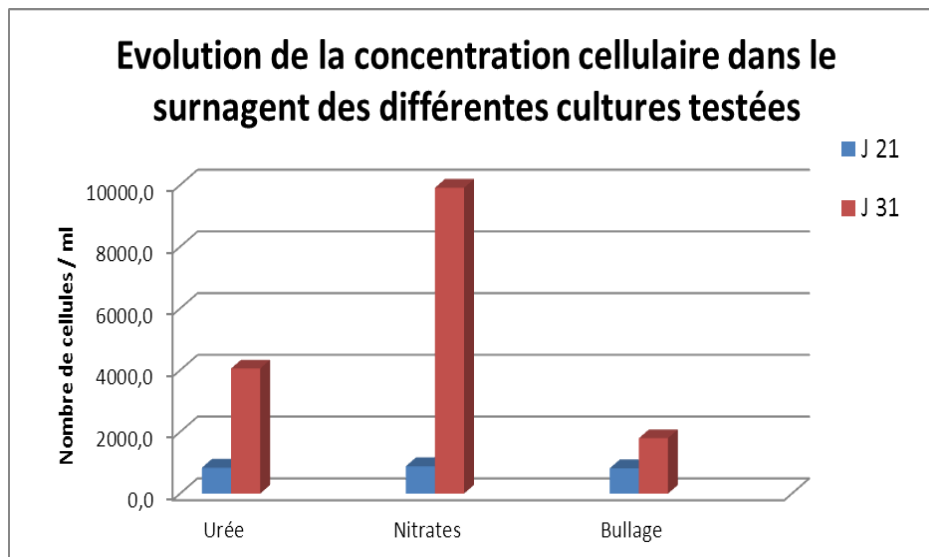
Le repiquage avec 1 l du milieu de culture d'un ballon semble être suffisant pour obtenir une récolte conséquente au bout de 30 jours. En revanche, l'utilisation d'un inoculum de 100 ml de culture ne permet pas une bonne croissance dès le départ et une attente plus longue avant la récolte est alors nécessaire.

La proportion de cellules contenue dans le culot et sur les parois est bien plus importante que celle contenue dans le surnageant. La division des cellules non mobiles semble donc bien plus rapide que les cellules mobiles.

Un repiquage avec les cellules du culot d'un ballon donne un ballon de culture contenant beaucoup plus de cellules benthiques déposées au fond. Une remise en suspension des cellules par bullage du ballon servant à repiquer est donc nécessaire pour homogénéiser le milieu.

Il n'existe pas de différence de quantité de toxine entre les cellules du culot et du surnageant. Il semble donc que la production de pinnatoxines G soit la même entre les cellules non mobiles et les cellules mobiles.

3) TECHNIQUE DE CULTURE



Le tableau ci-dessus représente l'évolution du nombre de cellules par millilitre. Un comptage a également été effectué à J 11. Cependant, la concentration étant trop faible, les résultats n'étaient pas exploitables.

Une croissance nette est observée dans les trois milieux. La croissance la plus forte est constatée dans le milieu contenant les nitrates. Cependant, l'observation microscopique dans 10 ml a révélé une plus grande proportion de cellules non mobiles dans le surnageant par rapport aux cellules mobiles.

Bien que la croissance soit moins flagrante dans la culture avec l'urée, les observations microscopiques ont toujours montré une grande quantité de cellules mobiles, plus que dans les autres modes de culture.

La croissance la plus faible se retrouve dans la culture avec bullage. Au microscope optique inversé, la quantité de cellules contenu dans le kiel semblait toujours inférieure à celles des autres ballons avec urée et nitrates.



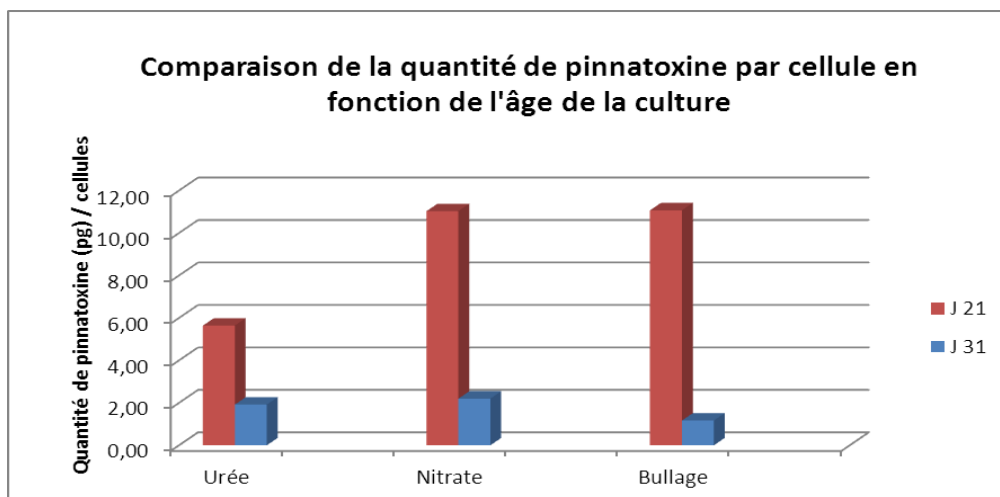
Photo 4 : Ballons des culture montrant les différents types de cultures testées : ballon avec urée (à gauche), ballon avec bullage (au centre) et ballon avec nitrates (à droite)

Le surnageant du ballon avec urée semble contenir la majorité de la masse cellulaire. En effet, très peu de cellules sont restées fixées à la paroi.

La majeure partie des cellules du ballon avec bullage sont fixées au fond du ballon.

Les cellules fixées s'étalent sur toute la paroi du ballon avec le nitrate comme source d'azote. Le surnageant semble également contenir une forte concentration de cellules.

Il est important de préciser que le développement de cellules fixées sur la paroi de tous les ballons s'observe sur le côté exposé à la lumière du néon.



La quantité de pinnatoxine la plus faible à J 21 se retrouve dans le ballon à l'urée avec 5,64 pg/cellules. Les autres cultures présentent la même quantité avec environ 11 pg/cellules.

La quantité de pinnatoxine G par cellules subit une très forte diminution à J 31. En effet, respectivement pour l'urée, le nitrate et le bullage, elle passe à 1,92 pg/cellules, 2,20 pg/cellules et 1,17 pg/cellules. Cette diminution est plus flagrante chez le ballon avec bullage.

Discussion

Pour conclure sur la méthode de culture, il semble que le nitrate comme source d'azote présente les meilleurs résultats, que ce soit au niveau du développement cellulaire ou à la production de pinnatoxine G. En effet, c'est la culture présentant le plus grand nombre de cellules par millilitre, bien que le comptage prennent en compte les cellules mobiles et non mobiles. La production de pinnatoxine G maximale se retrouve également dans les ballon avec le nitrate.

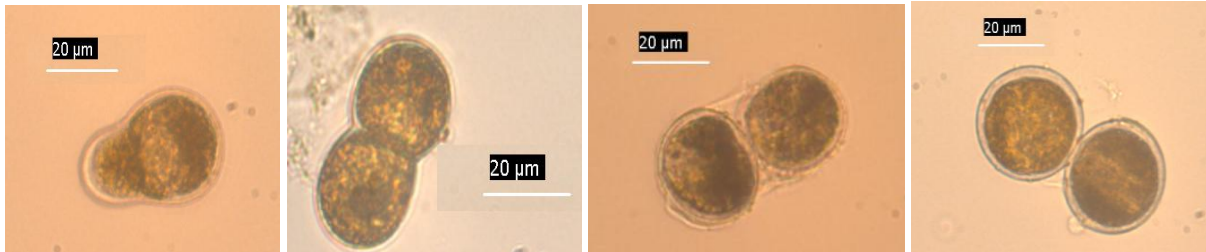
L'urée comme source d'azote semble favoriser le développement des cellules mobiles. En effet, l'observation microscopique révèle une plus forte proportion de cellules mobiles et la paroi du ballon contient peu de cellules fixées. Cependant, le comptage indique un développement moins rapide que la culture au nitrate. Il est donc à envisager que la division des cellules non mobile soit plus rapide que celle des cellules mobiles.

La culture avec bullage est à exclure. En effet, l'action des bulles doivent pousser les cellules sur le fond du ballon provoquant leur fixation sur la paroi. Le surnagent de ce type de culture présente également la plus faible concentration cellulaire. Il sera tout de même intéressant de comparer les résultats de la récolte avec celle des ballon contenant les nitrate qui pourrait vérifier ou non l'hypothèse de la division cellulaire des cellules non mobiles.

La diminution de la quantité de pinnatoxine G par cellule est surprenante. En effet, il a été démontré que la quantité de pinnatoxine par gramme d'algue ne subissait pas de variations, au moins à partir de J 34. Cette diminution pourrait être expliquée par différentes hypothèses. La production a pu être stoppée par les cellules à partir de J 21. La transformation de la pinnatoxine G en une autre pinnatoxine pourrait également expliquer cette diminution. Selon Rhodes et al (2011(a)), la pinnatoxine G serait le précurseur de la formation des pinnatoxine A et C. Cependant, cette diminution peut aussi venir d'une erreur de manipulation.

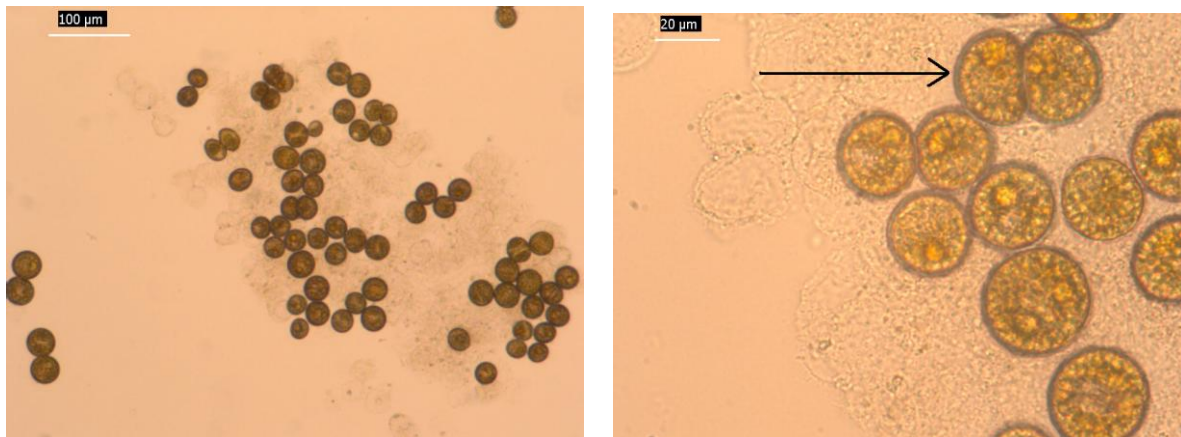
Il serait alors intéressant d'effectuer une autre extraction et un autre comptage vers J 41 pour vérifier si la quantité diminue toujours ou si elle revenait à celle de J21 ; ce qui démontrerait un erreur de manipulation à J 31.

4) OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES



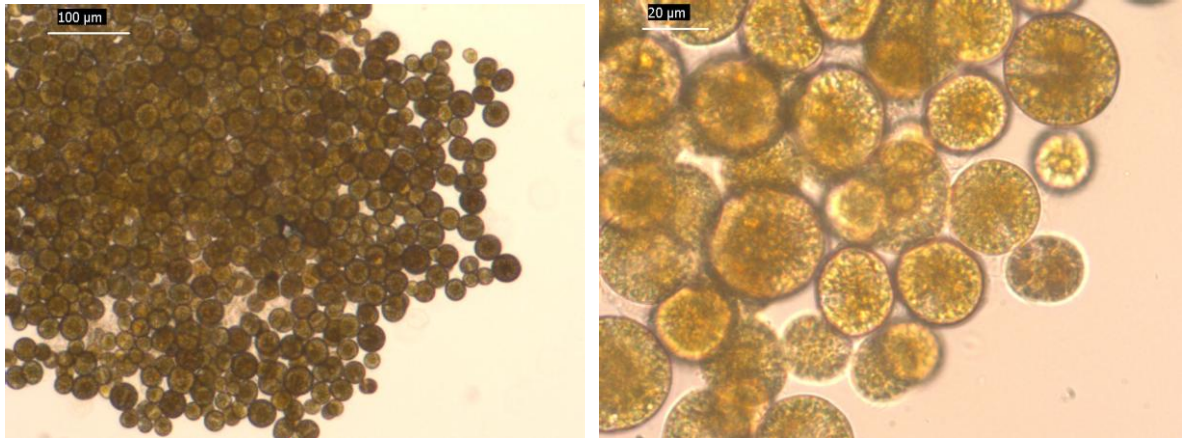
Photos 5 : Observation microscopique de cellules non mobiles prélevées dans le surnagent (x 40)

Les photos ci-dessus présentent des cellules non mobiles observées au microscope optique et prélevées dans le surnagent. Matsuoka et Fukuyo (2000) expliquent que les kystes temporaires sont capables de se diviser dans une pellicule, contrairement aux kystes végétatifs. On peut donc conclure que les cellules non mobiles du surnagent sont des kystes temporaires. Les photos ci-dessus présenteraient donc les différentes étapes de la division cellulaire.



Photos 6 : Observations microscopiques d'un agrégat à J19 (x 10 (à gauche), x 40 (à droite))

Les 2 photos présentent une observation microscopique d'un agrégat prélevé dans le fon d'un inoculum de 19 jours. La grappe de cellules visible montre relativement peu de cellules. Cependant, la quantité de mucus autour de ces dernières est conséquente. La flèche sur la deuxième photo expose deux cellules qui semblent se diviser. Ceci montrerait alors que les cellules présentes dans les grappes soient également des kystes temporaires.



Photos 7 : Observation microscopique d'un agrégat à J42 (x 10 (à gauche), x 40 (à droite))

Les 2 photos ci-dessus exposent également une grappe de cellules prélevée au fond d'un inoculum, mais 42 jours après repiquage. La grappe contient bien plus de cellules que celle de 19 jours. Le mucus est aussi bien moins visible autour des cellules. En raison du grand nombre de cellules qui compose la grappe, il n'a pas été possible de repérer une division cellulaire. En effet, deux cellules collées l'une à l'autre pourrait, en fait, signifier qu'elles sont simplement superposées. Ces cellules ne peuvent donc pas être identifiées avec certitude comme étant des kystes temporaires.

IV. CONCLUSION

La culture de masse de *Vulcanodinium rugosum* a donc permis de récolter une masse algale de plus de 100 g. La pinnatoxine sera alors extraite pour effectuer des tests de toxicité.

La culture de *Vulcanodinium rugosum* n'a pas posé de problèmes en particulier. En effet, sa croissance est continue et aucune culture n'a subi de contamination, bien que plusieurs manipulations ont été réalisées sur certains ballons (urée, nitrates, bullage).

Plusieurs techniques de culture ou de récolte ont été testées et une méthode peut alors ressortir afin d'obtenir une bonne récolte au bout de 30 jours. Le repiquage doit être effectué avec au moins 1 l d'une culture d'au moins 30 jours dans 3 l de milieu. Ce repiquage permet un bon départ de la croissance des cellules et rend possible une dilution à 7 l environ 10 jours après le repiquage, puis ensuite à 20 jours où on peut aller jusqu'à 10 l. La récolte peut ensuite être effectuée à J 30 avec une moyenne de 15 gramme de masse algale sur 4 ballons de 10 l.

Le développement des cellules accrochées à la paroi s'effectue surtout du côté exposé à la lumière du néon. Il est alors conseillé de tourner les ballons tous les 2-3 jours pour que la fixation des cellules ne se fasse pas que d'un côté du ballon.

Il serait intéressant d'étudier le cycle de vie de *V. rugosum* pour tenter d'obtenir un maximum de cellules dans le surnageant. En effet, la formation de kystes pourrait être ralentie et la culture améliorée si certaines réponses étaient apportées. Peut-il former des kystes végétatifs ? La formation de kystes provient-t-il de son cycle de vie ou d'un stress dû à au milieu ? L'urée produit-il un milieu favorable qui implique une meilleure croissance des cellules mobiles ou brise-t-il son cycle de vie en empêchant la cellule de s'enkyster ?

BIBLIOGRAPHIE

- MATSUOKA, FUKUYO, 2000 : Technical Guide for Modern Dinoflagellate Cyst Study - WESTPAC-HAB/WESTPAC/IOC
- NEZAN, CHOMERAT, 2010 : *Vulcanodinium rugosum* gen. et sp.nov. (Dinophyceae), un nouveau dinoflagellé marin de la côte méditerranéenne – *Cryptogamie, Algologie*, 2011, 32 (1) : 3-18
- RHODES, SMITH, SELWOOD, McNABB, GINKEL, HOLLAND, MUNDAY, 2010 : Production of pinnatoxins by a peridinoid dinoflagellate isolated from Northland, New Zealand – *harmfull Algae* (2010) 384 – 389
- RHODES, SMITH, SELWOOD, McNABB, MOLEENAR, WILKINSON, HALLEGRAEFF, 2011 (a) : Production of pinnatoxins E, F and G by scrippsielloid dinoflagellates isolated from Franklin Harbour, South Australia, *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 45 :4, 703-709
- RHODES, SMITH, SELWOOD, McNABB, MUNDAY, SUDA, MOLENAAR, HALLEGRAEFF, 2011 (b): Dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum* identified as the causative organism of pinnatoxins in Australia, New Zealand and Japan – *Phycologia* (2011) Volume 50 (6), 624-628
- SELWOOD, O'MILES, WILKINS, VAN GINKEL, MUNDAY, RISE, McNABB, 2010 : Isolation, structural determination and acute toxicity of pinnatoxins E, F, and G – *J. Agric Food Chem.* 2010, 58, 6532-6542
- SHANE, HELLYER, ANDREW, SELWOOD, RHODES, STEVEN KERR, 2011 : Marine algal pinnatoxins E and F cause neuromuscular block in an in vitro hemidiaphragm preparation – *Toxicon* 58 (2011) 693 - 699
- SMITH, RHODES, SUDA, SELWOOD, 2011 : A dinoflagellate producer of pinnatoxin G, isolated from sub-tropical Japanese waters – *Harmfull Algae* 10 (2011) 702 -705

ANNEXE 1

Récapitulatif des séries de culture du *Vulcanodinium rugosum*

Série 1 :

- Repiquage le 27 octobre – Niveau 4 L
- Dilution le 25 novembre (**J 29**) – Niveau 8-9 L
- Récolte de 4 ballons le 07 et 08 décembre (**J 41 et J 42**)

⇒ Résultats de la récolte :

- Ballon 1 : 6,702 g
- Ballon 2 : 7,455 g
- Ballon 3 : 6,919 g
- Ballon 4 : 5,548 g
- **TOTAL : 26,624 g**

Série 2 :

- Repiquage le 25 novembre – Niveau 3 L
- Dilution le 30 novembre (**J 5**) – Niveau 5 L
- Dilution le 13 décembre (**J 18**) – Niveau 10 L
- Récolte de 4 ballons le 28 et 29 décembre (**J 33 et J 34**)

⇒ Résultats de la récolte :

- Ballon 1 : 3,321 g
- Ballon 2 : 5,248 g
- Ballon 3 : 4,741 g
- Ballon 4 : 5,566 g
- **TOTAL : 18,876 g**

Série 3 :

- Repiquage le 12 décembre avec le 5^{ème} ballon de la série 1 – Niveau 4 L
- Dilution le 30 décembre (**J 19**)
 - 2 ballons de 8 L (dont un avec 4 L de milieu L1 contenant 10 mL de phosphore en plus)
 - 2 ballons de 9 L
 - 1 ballon de 10 L
- Récolte de 4 ballons le 11 et 12 janvier (**J29 et J30**)

⇒ Résultats de la récolte :

- Ballon 1 (phosphore) (8 L): 4,194 g
- Ballon 2 (8 L) : 3,925 g
- Ballon 3 (10 L) : 4,727 g
- Ballon 4 (9 L) : 3,276 g
- **TOTAL : 16,122 g**

Série 4 :

- Repiquage le 21 décembre – Niveau 2 L + 100 mL de milieu d'innoculum (J 30)

- Dilution le 05 janvier (**J 15**) – Niveau 5 L
- Récolte de 4 ballons le 30 et 31 janvier (**J 39 et J40**)
2 récoltes appliquées pour 1 ballon :
 - + Surnagent : les 6 premiers litres
 - + Culot : le dernier litre contenant les cellules accrochées au fond

⇒ Résultat de la récolte :

- Ballon 1 : Surnagent = 0,567 g / Culot = 2,349 g
 => 2,916 g **24%** de cellules surnageantes
- Ballon 2 : Surnagent = 0,518 g / Culot = 2,54 g
 => 3,098 g **20%** de cellules surnageantes
- Ballon 3 : Surnagent = 0,855 g / Culot = 2,346 g
 => 3,201 g **36%** de cellules surnageantes
- Ballon 4 : Surnagent = 0,911 g / Culot = 2,588 g
 => 3,499 g **35%** de cellules surnageantes
 - **TOTAL : 12.714 g**

Série 5 :

- Repiquage le 30 décembre (**J 0**) – Niveau 4 L = 2L de milieu L1 + 2 L environ de la série S2 (J 34)
 - ballon 1 : 2 L du fond du ballon avec le culot remis en suspension avec des billes
 - ballons 2, 3, 4 et 5: 2 L de surnagent du ballon
- Dilution le 13 janvier (**J 14**) – Niveau 7 L
- Récolte de 4 ballons le 24 et 25 janvier (**J 25 et J26**) (pour faire de la place sur l'étagère. La culture paraissait également bien avancée, sans doute en raison de la forte quantité de culture du repiquage précédent servant à repiquer)
2 récoltes appliquées pour 1 ballon :
 - + Surnagent : les 6 premiers litres
 - + Culot : le dernier litre contenant les cellules accrochées au fond

⇒ Résultat de la récolte :

- Ballon 1 : Surnagent = 0,78 g / Culot = 5,281 g
 => 6,061 g **15%** de cellules surnageantes
- Ballon 2 : Surnagent = 0,806 g / Culot = 2,745 g
 => 3,551 g **29%** de cellules surnageantes
- Ballon 3 : Surnagent = 0,631 g / Culot = 2,362 g
 => 2,993 g **29%** de cellules surnageantes
- Ballon 4 : Surnagent = 0,61 g / Culot = 2,694 g
 => 3,304 g **23%** de cellules surnageantes
 - **TOTAL : 15,909 g**

Série 6 :

- Repiquage le 06 janvier – Niveau 4 L = 3 L de milieu + 1 L d'un ballon de la série S3 (J 25)
 - 2 ballons avec bullage
 - 3 ballons sans bullage

- 1 ballon avec urée à la place de NaNO₃ (1 ml/l d'urée à 3g/l) – Niveau 5 L
- Dilution le 23 janvier (**J 17**) – Niveau 7 L
- Dilution le 07 février (**J 32**) – Niveau 9 – 10 L

Série 7 :

- Repiquage le 13 janvier – Niveau 4 L = 3 L de milieu + 1 L du ballon de la série S3 (J 31) Remise en suspension des cellules par bullage
- Dilution le 24 janvier (**J 11**) – Niveau 7 L
- Dilution le 31 janvier (**J 18**) – Niveau 10 L
- Récolte le 13 et 14 janvier (**J31 et J32**)
 - ⇒ Résultats de la récolte :
 - Ballon 1 : 4,599 g
 - Ballon 2 : 3,38 g
 - Ballon 3 : 3,58 g
 - Ballon 4 : 3,785 g
 - **TOTAL : 15,344 g**

Série 8 :

- Repiquage le 24 janvier – Niveau 4 L = 3 L de milieu + 1 L d'un ballon de la série S5 (J 25) avec remise en suspension des cellules par bullage
- Dilution le 07 février (**J 14**) – Niveau 7 L
- Dilution le 14 février (**J 21**) – Niveau 10 L

Série 9 :

- Repiquage le 31 janvier – Niveau 4 L = 3 L de milieu + 1 L d'un ballon de la série S5 (J 32)
- Dilution le 15 février – Niveau 7 L

Série 10 :

- Repiquage le 15 février – niveau 5 L = 3 L de milieu + 2 L du dernier ballon de la série S4

Ce récapitulatif est également disponible dans un tableau Excel sous N:\CDD\2011 LE ROY Evan\Récapitulatif culture

ANNEXE 2

PROTOCOLE DE RECOLTE DE *Vulcanodinium rugosum* DES BALLONS DE 10L

Les récoltes peuvent être effectuées à raison de 2 ballons par jour. Les démarches du protocole sont donc à effectuer en double.

Récolte du surnagent des ballons de culture :

- Prendre 3 flacons (1L) à centrifugation par ballon
- Verser le surnagent des ballons de culture dans les flacons à centrifugation
- Centrifuger les flacons (*paramètres : 2500 g, 20 minutes, 4°C*)
- Après centrifugation, retirer le surnagent des flacons en laissant une petite partie (environ 20mL) où il reste quelques cellules qui ne sont pas collées au culot
- Conserver environ 1L de surnagent dans un bûcher
- Garder le culot dans les flacons
- Verser du surnagent des ballons de culture par-dessus les culots et centrifuger (même paramètre)
- Continuer cette opération jusqu'à ce qu'il ne reste plus qu'environ 1L dans le ballon

Grattage des ballons :

- Mettre des billes de 0,7 cm de diamètre (environ 10) dans le ballons de culture
- Faire tourner les billes en agitant le ballon pour retirer les cellules des parois
- Verser la solution contenant les cellules fixées et les billes dans un filtre à grande maille pour laisser passer les cellules et récupérer les billes
- Rincer le ballon avec le surnagent récupéré des flacons à centrifugation et récupérer la solution
- Centrifuger (même paramètre) la solution en la versant dans les flacons par-dessus les culots
- Vider le surnagent en laissant toujours les 20 mL.

Récupération de la masse algale dans un tube :

- Placer quelques billes (environ 5) dans un des flacons de 1L pour décrocher le culot et le mélanger à la partie de surnagent
- Verser la solution dans un tube à centrifugation de 50 mL
- Centrifuger la solution (*paramètres : 2500 g, 10 minutes, 4°C*)
- Jeter le surnagent
- Rincer le flacon avec le surnagent du ballon récupéré précédemment pour récupérer le reste des cellules

- Transférer la solution de rinçage et les billes dans le deuxième flacon pour décoller le culot
- Ajouter la solution dans le tube à centrifugation par-dessus le culot
- Centrifuger
- Recommencer cette opération jusqu'à ce que les flacons soient vidés et rincés
- Peser le résultat et conserver le tube à -20°C

ANNEXE 3

PROTOCOLE D'EXTRACTION PINNATOXINES

Protocole d'extraction :

- Prélèvement de 200mg de culot d'algues mis dans un tube Falcon de 15 ml
- Ajout de 5ml de méthanol dans le tube
- Vortex
- Sonication du tube pendant 15 min
- Centrifugation à 3500 tours/min soit 2500g pendant 10min à 4°C
- Piptage du surnagent à la pipette pasteur transféré dans une seringue
- Filtration du surnagent (à l'aide de la seringue) avec filtre de $0.2\mu\text{m}$ stocké dans un second tube Falcon
- Piptage de 1ml de la solution filtrée stocké dans un vial à -20°C

Analyse LC-MS :

Pour analyse LC-MS, les échantillons réalisés sont dilués au 50ème
Méthode de dilution : $20\mu\text{l}$ sont prélevés dans la solution mère et dilués dans $980\mu\text{l}$ de MeOH, ainsi on obtient la solution F1.

Annexe 3 : Rapport de stage M1 paramètres écophysologiques (Ifremer)

Etude de l'influence des facteurs environnementaux sur la production de pinnatoxines par *Vulcanodinium rugosum*



Faustine VANEL
Master 1 BSE option EGB

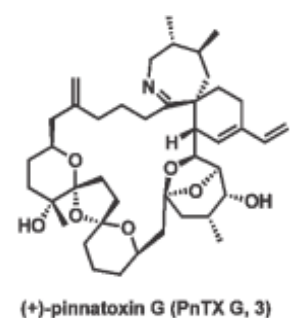
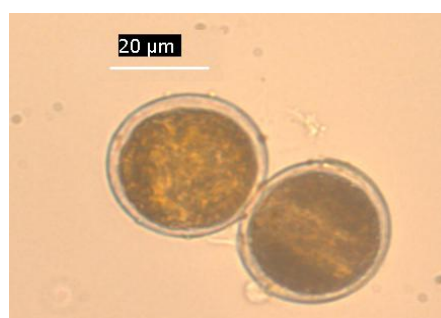
Encadrants : HESS Philipp, SECHET Véronique
IFREMER, Environnement, Microbiologie et Phycotoxines, Centre Atlantique

Résumé: Suite à la caractérisation de la nouvelle espèce de dinoflagellé toxique, *Vulcanodinium rugosum*, une étude a été réalisée afin de comprendre la corrélation entre l'environnement et sa prolifération. Sa mise en culture, avec les milieux L1, K et f/2, a été réalisée ainsi qu'une quantification de la toxine par chromatographie liquide couplée au spectromètre de masse (LC-MS). Pour étudier l'effet sur le biofilm, les nitrates ont été changés au profit de l'urée pour les milieux L1 et f/2. Cette expérimentation a permis de démontrer que cette algue a une meilleure croissance sur les milieux L1 et f/2, qui ont été conçus pour des organismes côtiers. De plus, une concentration de 3 g/l d'urée permet un meilleur dénombrement grâce à une diminution du mucus, qui est plus fragile, tout en assurant une bonne production de toxines. Cependant, des expérimentations avec différentes conditions de culture sont menées afin de compléter cette étude.

Mots-clés: *Vulcanodinium rugosum*, dinoflagellé, pinnatoxines, conditions environnementaux, culture cellulaires.

Abstract: Following the characterization of a new toxic dinoflagellate, *Vulcanodinium rugosum*, a study was conducted to understand the correlation between the environment and its proliferation. Its cultivation, with L1, K and f/2 media was realized, and a quantification of the toxin by liquid chromatography – mass spectrometry (LC-MS). To study the effect on the biofilm, nitrate was replaced by urea for L1 and f/2 media. This experiment showed that this alga grows better using media L1 and f/2, which have been designed for coastal organisms. Moreover, a concentration of 3 g/l of urea allows for easier counting thanks to decreased mucus, which is more fragile, while appropriate toxin production. Nevertheless, experiments with different culture conditions are conducted to complete this study.

Keywords: *Vulcanodinium rugosum*, dinoflagellate, pinnatoxin, environmental conditions, cells culture.



Introduction

Suite aux travaux de Rhodes *et al.* (2010), Nézan et Chomerat (2011) ont caractérisé et nommé une nouvelle espèce de dinoflagellé. En effet, après isolement effectué à partir d'eau de mer, ils ont pu mettre en évidence sa morphologie avec la présence d'une paroi à thèques cellulodiques mais ne comportant pas d'épines ou de cornes et avec un apex en forme de volcan (Annexe 1). C'est à partir de cette dernière singularité que cette micro-algue arrondie a été nommée *Vulcanodinium rugosum*. Son identification a été d'autant moins évidente que c'est un organisme que l'on ne retrouve que rarement sur les côtes méditerranéennes, avec une faible abondance dans les prélèvements, au niveau de trois sites, Port St Louis dans le golfe de Fos-sur-Mer, le clos de la Comète en Camargue et dans l'étang d'Ingril sud près de Sète. C'est à partir de ce dernier site de prélèvement qu'a pu être isolée l'algue, de par sa plus forte abondance, qui a permis de réaliser une étude approfondie de sa morphologie (Nézan et Chomerat 2011) et son identification par la biologie moléculaire. De plus, des tests de toxicité sur souris, effectués en parallèle, avec des extraits de coquillages ont révélé la présence de toxines avec l'apparition de symptômes neurologiques.

Dans le cadre d'un stage de M1, j'ai intégré le laboratoire Phycotoxines du centre de Nantes de l'IFREMER (**I**nstitut **F**rançais de **R**echerche pour l'**E**xploitation de la **M**er). Il fait partie de l'unité de recherche « Environnement, Microbiologie et Phycotoxines » (EMP) et étudie les toxines algales réglementées et émergentes mais aussi l'interaction des microalgues avec les bivalves. Il est aussi en charge de la surveillance sanitaire hebdomadaire des contaminations des coquillages commercialisés. C'est dans un souci de connaissances et de prévention, vis-à-vis des zones de cultures, en particulier celles voisines de l'étang d'Ingril, que mon stage s'est déroulé avec l'étude de l'effet des conditions environnementales sur la production de pinnatoxine G. Cette analyse a été réalisée par la mise en culture de l'algue en utilisant différents milieux. Des tests sur l'effet de la température et de la salinité sont en cours de réalisation. Un suivi trihebdomadaire de la croissance cellulaire par comptage au microscope et une extraction toxinique quantifiée par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (LC-MS) a été mise en place.

Matériels et méthodes

Pour la réalisation de cette étude, la souche a été prélevée dans la partie sud de l'étang d'Ingril puis maintenue en activité, après isolement, dans une boîte de culture en présence d'eau de mer Méditerranée enrichie, avant d'être livrée au laboratoire de Nantes.

La culture cellulaire

Dans un souci d'homogénéité dans le déroulement de l'expérience, l'ensemencement des boîtes de culture a été réalisé à partir d'une solution mère contenant 4/5 du volume total de milieu stérile et 1/5 d'une ancienne culture. Ce mélange a été réparti par volume de 25 ml dans des flacons de culture cellulaires de 50 ml puis mis dans une chambre thermorégulée avec un cycle de lumière de 16:8 Jour:Nuit. Pour chaque jour de collecte de données, une culture en doublon a été mise en place avec une boîte servant pour la quantification de la pinnatoxine G par LC-MS et l'autre servant pour le suivi de la croissance algale par comptage au microscope.

Le suivi de la croissance algale

Le comptage des cellules a été réalisé par une lecture visuelle au microscope à l'aide d'une cellule de Nageotte. Cette lame est divisée en deux chambres, sur chacune est gravée une grille de 10 mm sur 10 mm séparées en deux fois 20 bandes de 0,25 mm de large. Cette cellule permet ainsi de dénombrer les organismes pour un volume défini de 25 µl par séries de 20 bandes. La fixation des cellules mobiles ainsi que la dissolution partielle du mucus, formé lors de la croissance, ont été obtenues par l'ajout de 400 µl de lugol additionné de 5% d'acide acétique par boîte puis mis au repos pendant 15-20 min. Pour une plus grande précision sur la concentration de cellules, un triplicata de 40 bandes a été réalisé à partir du même flacon.

L'extraction et la quantification des toxines

L'extraction au méthanol (Rhodes *et al.* 2010) a été effectuée sur le culot d'algues obtenu après centrifugation (3000g, 15 min, 4°C). Une première extraction, des tubes de centrifugation, a été effectué avec 1ml de méthanol puis quatre lavages avec 250 µl avec une récupération du substrat. On récupère donc un volume final de 2 ml de substrat. Pour s'assurer de la destruction des cellules, en plus du choc osmotique à l'aide du méthanol, une sonification a été employée, en plus de la méthode de Rhodes *et al.* (2010), pendant 20 min, à une amplitude de 25% et une pause de 10 secondes toutes les 20 secondes pour éviter la surchauffe de la solution. 500 µl de filtrat ont été récupérés après une première centrifugation

(15000g, 10 min, 4°C) pour sédimenter les débris cellulaires. L'extrait est filtré sur une membrane de 0,2 µm pour être analysé en LC-MS.

La quantification en pinnatoxine G, mise au point en interne par l'équipe, a été obtenue à partir de l'analyse des filtrats par LC-MS en utilisant une gamme étalon allant de 0,5 à 100 ng/ml. Le système utilisé était composé d'une chaîne chromatographique Nexera (Shimadzu) et d'un spectromètre de masse 5500QTrap (AB Sciex). La colonne utilisée était une colonne C8, 3µm, Hyperclone MOS, 50x2,0 mm (Phenomenex) maintenue à 25°C durant l'analyse des 5µl d'échantillons injectés. L'analyse a été menée à un débit de 0.2 ml/min avec un mélange binaire A (100% eau avec 2 mM de formate d'ammonium et 50 mM d'acide formique) et B (95%/5% acétonitrile/eau avec 2mM de formate d'ammonium et 50mM d'acide formique). Le gradient d'éluion débutait avec 30% de B et passait à 95% en 2,5 min. Ce mélange (95% de B) restait stable jusqu'à 10 min puis les conditions initiales étaient retrouvées en 3 min. La pinnatoxine G a été détectée en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) sur cinq transitions ion parent-ion fils (694,2 -> 458,3, 634, 440,2, 658,4, 694,2 -> 164,1) permettant de confirmer ou non la présence de la toxine. La quantification a été effectuée sur la transition 694,2 -> 164,1 qui possède la réponse la plus intense.

Les conditions de culture

Une mise en culture en présence des trois milieux de base a permis de commencer cette étude, dans le but de sélectionner le plus approprié par la suite, pour se faire, les milieux K (Guillard et Ryther 1962, Guillard 1975), L1 (Keller *et al.* 1987) et f/2 (Guillard et Hargave 1993) ont été testés (Tab. I).

Tableau I : Composition des milieux de culture utilisés

Composant	Milieu K	Milieu L1	Milieu f/2
	nitrate de sodium (NaNO ₃)		
	dihydrogenophosphate de sodium (NaH ₂ PO ₄)		
solution vitaminique	thiamine (vit. B1) biotine (vit. H) cyanocobalamine (vit. B12)		
Solution d'éléments traces	Na ₂ EDTA, 2H ₂ O 1,11x10⁻⁴ M	Na ₂ EDTA, 2H ₂ O 1,17x10⁻⁵ M	
	chlorure de fer (FeCl ₃ , 6H ₂ O) chlorure de manganèse (MnCl ₂ , 4H ₂ O) sulfate de zinc (ZnSO ₄ , 7H ₂ O) chlorure de cobalt (CoCl ₂ , 6H ₂ O) sulfate de cuivre (CuSO ₄ , 5H ₂ O) molybdate de sodium (Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O)		
	acide de sélénium (H ₂ SeO ₃)		
	chlorure d'ammonium (NH ₄ Cl) Na-b glycérophosphate tris-base à pH 7.2	sulfate de nickel (NiSO ₄ , 6H ₂ O) orhovanadate de sodium (Na ₃ VO ₄) chromate de potassium (K ₂ CrO ₄)	

Les concentrations des différents composés des milieux sont détaillées dans l'annexe 2. Après la sélection de milieux convenant le mieux à l'algue, l'effet de l'urée (Rhodes *et al.* 2010) a été expérimenté vis-à-vis de la capacité de l'algue à se maintenir dans la colonne d'eau. Pour cela, la source d'azote a été changée, pour les milieux L1 et f/2, avec le remplacement du nitrate de sodium (NaNO_3) avec une concentration finale de $8,82 \times 10^{-4}$ M par de l'urée à une concentration finale de 3 g/l ou 3,5 g/l. En effet selon cet article (Rhodes *et al.* 2010), l'urée permettrait de conserver la mobilité des cellules et de retarder l'enkystement dans le mucus, ce qui favoriserait l'observation et le comptage cellulaire au microscope. Par la suite, une mise en culture des algues, avec une variation de la salinité du milieu et la température d'incubation, a été réalisée. Pour cela, la chambre de culture a été maintenue à 22°C et un cycle de lumière de 16;8 L;D pour l'étude de la salinité alors qu'un caisson avec un variateur thermique a été employé toujours avec le même cycle lumineux.

Résultats

Suivi de la croissance cellulaire

En général, une courbe de croissance cellulaire en fonction du temps peut être divisée en trois parties. Le début est une phase de latence qui dure un à deux jours pendant laquelle les organismes s'adaptent aux nouvelles conditions de culture. Puis, on observe une phase exponentielle se traduisant par une forte augmentation du nombre de cellules dans le milieu dans un court laps de temps d'une semaine environ. Suite à cette période de croissance, il y a la phase stationnaire avec une stabilisation du nombre d'organismes, phases étant caractérisée par un ralentissement du métabolisme et un ratio natalité/mortalité de 1 qui précède la phase de sénescence. Pour une culture d'algues, l'utilisation d'une échelle, avec une ordonnée en log, n'est pas employée, ce choix s'explique par une concentration moins élevée de cellules par unité de volume lors de la culture ainsi qu'une moins bonne visualisation des différences entre les courbes. De plus, le mode de comptage cellulaire, triplicata de 40 bandes par microscopie optique, induit un biais du nombre de cellules calculé qui va être corrigé dans de prochaines expériences suite à l'optimisation des conditions de cultures et l'utilisation d'un compteur à particule. L'estimation de la production cellulaire journalière est calculée avec les points les plus extrêmes de la phase de croissance exponentielle. En effet, les calculs précis vont être réalisés ultérieurement par logiciel pour pouvoir effectuer une comparaison plus précise.

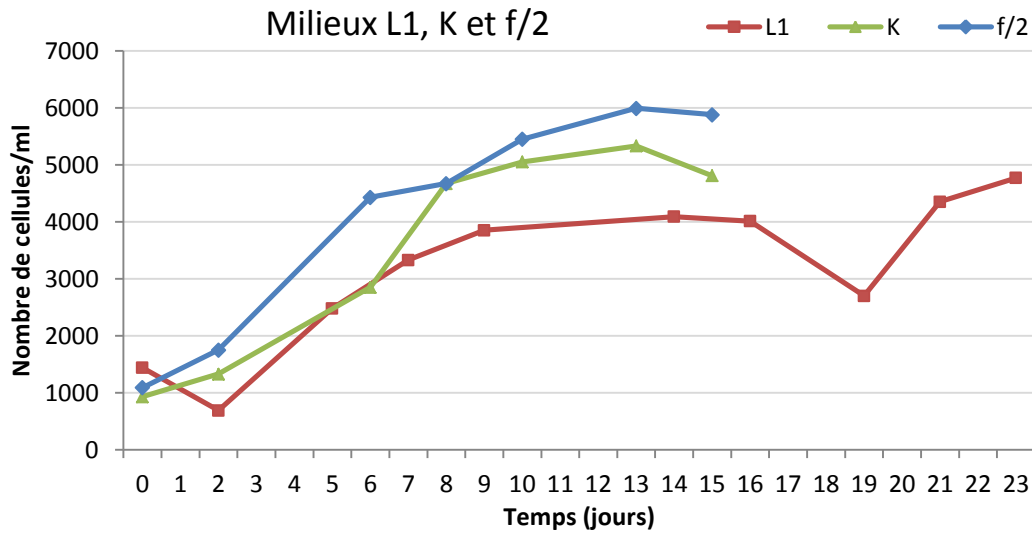


Figure 1 : Courbes de croissance cellulaire (en cellules/ml) pour les milieux de base L1, K et f/2 en fonction du temps.

La première série d'expérience avait pour but de déterminer la préférence des algues entre trois milieux (L1, K, f/2) avec une sélection de celui qui allait servir de base pour la suite de l'étude. Ainsi, la croissance (Fig. 1) suit le modèle théorique avec une phase de latence d'une journée pour les milieux K et f/2 et de deux jours pour le milieu L1 avec une légère mortalité. Ensuite, on observe une forte augmentation cellulaire pendant huit à neuf jours avant la phase stationnaire. Cependant, le nombre maximal de cellules n'est pas le même pour chaque milieu de culture puisque pour le milieu L1, il y a une stabilisation vers 4000 cellules/ml alors que pour le milieu K, le maximum est entre 5000 et 6000 cellules/ml pour f/2. De plus, la production de cellules, durant la phase exponentielle, est relativement similaire avec 395, 413, 396 nouvelles cellules par jours pour L1, K et f/2 respectivement.

Afin d'augmenter la proportion de cellules mobiles par rapport aux cellules fixées, l'urée a été testée comme source d'azote à la place du nitrate de sodium (NaNO_3). L'évolution de la concentration cellulaire (Fig. 2) en fonction du temps est similaire pour les milieux L1 et f/2 en présence d'urée à une concentration de 3 ou 3,5 g/l. Les courbes, du milieu L1, commencent avec une phase exponentielle de forte croissance le quatre premiers jours avec 3 g/l d'urée et de onze jours pour 3,5 g/l d'urée malgré une hausse lente au début. Les courbes montrent, à la suite, une phase de croissance plus faible pour le L1 avec 3 g/l d'urée et une

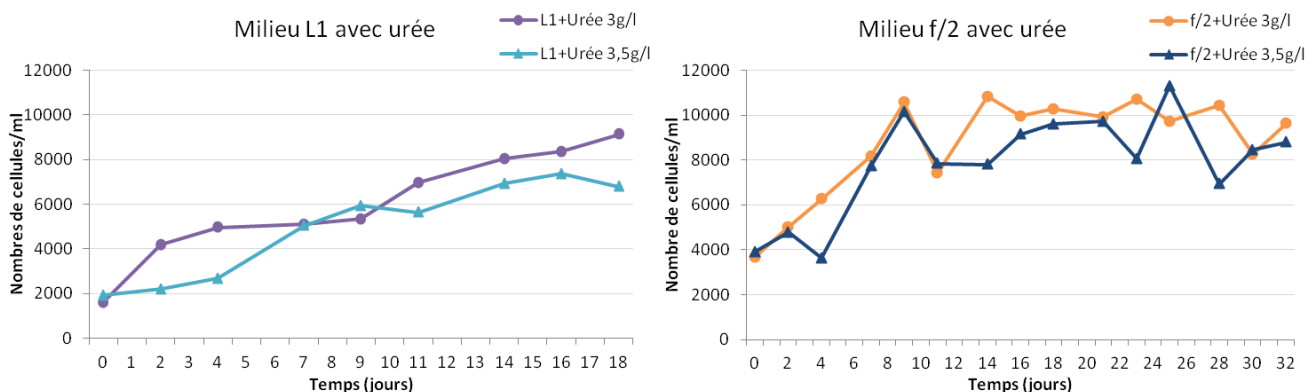


Figure 2 : Courbes de croissance cellulaire (en cellules/ml) en fonction du temps pour les milieux de base L1 et f/2 avec ajout d'urée.

stabilisation à la fin de l'expérience pour l'urée à 3,5 g/l. Les concentrations cellulaires maximales atteintes sont bien supérieures en présence d'urée, elles sont de 7000 et 9000 cellules/ml pour les concentrations de 3 et 3,5 g/l respectivement. La courbe de f/2 avec 3 g/l d'urée est formée, quant à elle, de deux parties en commençant directement par la phase exponentielle d'une durée de dix jours alors que les 22 jours suivant correspondent à la phase stationnaire. La comparaison de f/2 avec 3,5 g/l d'urée suit le schéma de la courbe avec 3 g/l d'urée puisque l'on observe une première partie exponentielle de dix jours environ, suivis d'une phase de stabilisation de 22 jours. La quantité de cellules lors de la phase stationnaire avoisine 9000 et 10000 cellules/ml pour les concentrations de 3 et 3,5 g/l d'urée. De plus, les productions de cellules sont différentes selon les conditions. Ainsi pour le milieu L1 avec 3 g/l d'urée, elle est de 379 nouvelles cellules par jours et de 468 cellules produites par jours avec 3,5 g/l d'urée. Alors que, le milieu f/2 contenant 3 g/l d'urée a une production de 689 organismes synthétisés par jours alors que 673 cellules sont produites par jours en présence de 3,5 g/l.

Suivi de la concentration de toxines

La courbe de concentration toxinique n'a pas de forme théorique précise comme la courbe de croissance cellulaire puisque la synthèse dépend du métabolisme de l'organisme et des facteurs environnementaux.

Avec le milieu L1 seul (Fig. 3), on observe deux phases : une de faible production durant les 13 premiers jours suivi d'une phase avec une hausse de la synthèse toxinique du jour 13 à 24. Ainsi, la concentration de toxines débute vers 8,5 ng/ml pour pratiquement doubler à 16 ng/ml. Pour le milieu K (Fig. 3), la concentration de pinnatoxine G montre un peu plus rapidement pour finir à une valeur quasi-identique à 15ng/ml. Les organismes, poussant dans le milieu f/2, ont fait une synthèse de toxines en deux périodes (Fig. 3). Ainsi,

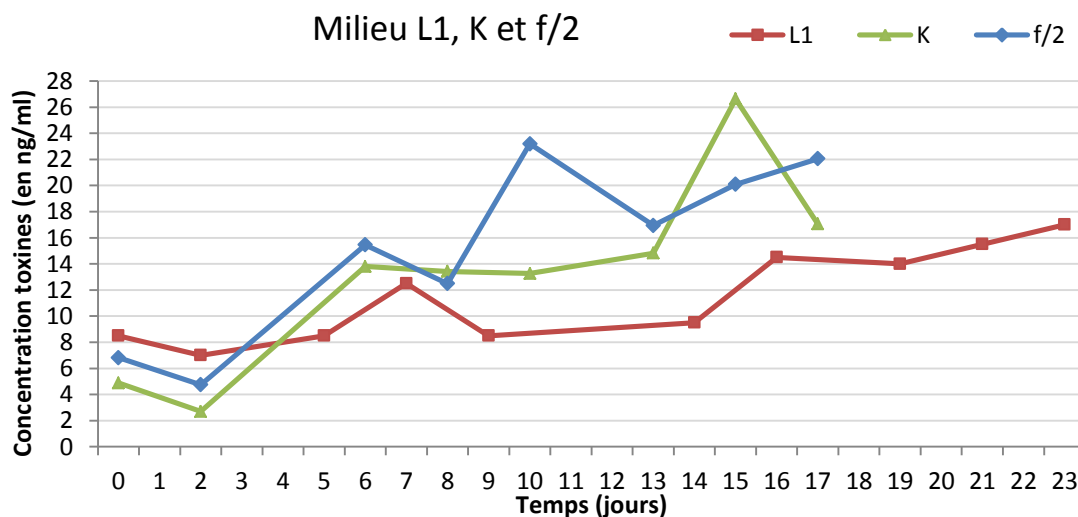


Figure 3: Courbes de concentration de toxines (en ng/ml) en fonction du temps pour les milieux de base L1, K et f/2.

les deux premiers jours de l'expérience, on observe une faible concentration suivi par une augmentation de la production de toxines durant les 16 jours suivants. Lors de cette expérience, on note une augmentation de la synthèse de toxines de 16ng.ml car elle passe de 6 ng/ml à 22 ng/ml.

Pour l'expérimentation en présence d'urée à 3 g/l avec le milieu L1 (Fig.4), on observe une courbe commençant avec une concentration stable puis elle augmente continuellement de 10 ng/ml à 17 ng/ml. Pour ce même milieu à une concentration de 3,5 g/l d'urée (Fig.4), on voit une courbe en cinq parties, qui suit la courbe de croissance cellulaire, débutant par une phase de de faible production et deux phases de maintien de la concentration entre coupé par des périodes de fortes productions. Ainsi, on note une hausse de 9 ng/ml avec une valeur initiale de 7 ng/ml pour finir à 16 ng/ml. Dans le milieu f/2 avec 3 g/l d'urée (Fig.4), on observe une courbe commençant par un premier point élevé à 14 ng/ml, suivi d'une période de moins forte synthèse de toxines avec un plateau ayant une concentration comprise entre 10 et 12 ng/ml. Alors qu'avec une concentration de 3,5 g/l d'urée (Fig.4), la synthèse de toxines augmente constamment mais faiblement tout au long de l'expérience puisqu'elle débute à 14,5 ng/ml pour finir à 16,5 ng/ml malgré un premier jour à 20 ng/ml.

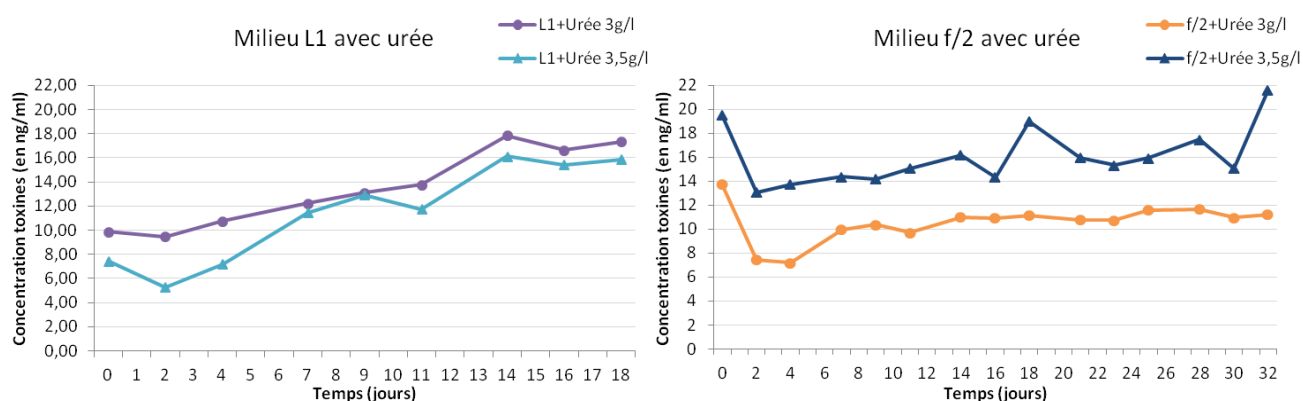


Figure 4: Courbes de concentration de toxines (en ng/ml) en fonction du temps pour les milieux de base L1 et f/2 avec ajout d'urée.

Suivi de la croissance cellulaire et de la toxicité pour les variations de température

Ces séries d'expérience ont permis de comparer les croissances cellulaires et la production de pinnatoxines selon différentes températures d'incubation et par extension, estimer la période de l'année de forte croissance dans le milieu naturel. Deux expériences avec une température de 25°C ont été effectuées, en effet lors du premier test - courbe bleu - (Fig.5), les boîtes de culture étaient à une distance plus élevée que pour les autres expériences donc un biais des conditions de culture a été relevé expliquant le recommencement. Ainsi, la courbe à 22°C forme les deux parties avec une forte croissance au début suivi d'une

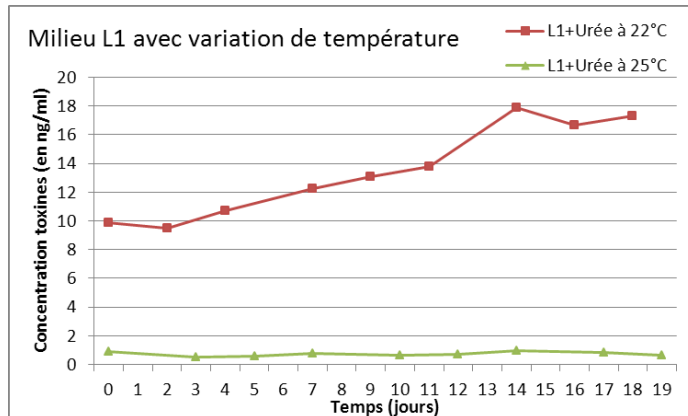
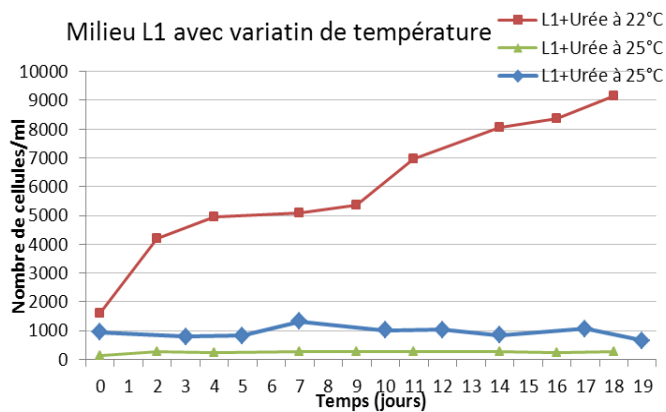


Figure 5 : Courbes de croissance cellulaire (cellules/ml) et de production de toxines (ng/ml) avec variation de la température.

augmentation cellulaire moins forte, alors qu'à 25°C, le nombre de cellule est stable tout au long de l'étude. De plus, la production de toxines est significativement plus faible à 25°C qu'à 22°C puisque la courbe reste stable vers 1 ng/ml alors qu'à 22°C, elle augmente pour passer de 10 à 17 ng/ml. La quantification de la deuxième expérience à 25°C n'a pas encore été effectuée lors de la rédaction de ce présent rapport.

Suivi de la croissance cellulaire et de la toxicité pour les variations de température

Ces séries d'expérience ont permis de comparer les croissances cellulaires et la production de pinnatoxines selon différentes salinités et par extension, estimer la période de forte croissance dans le milieu naturel en fonction des intempéries. Ainsi, la courbe à 40‰ (Fig.6) forme les deux parties avec une forte croissance au début suivi d'une augmentation cellulaire moins forte. Alors qu'à 38‰ et à 35‰, le nombre de cellule est plus stable tout au long de l'étude même si une hausse est observée à 38‰. De plus, la production de toxines est significativement plus faible à 38‰ qu'à 40‰ puisque la courbe reste stable vers 1,5 ng/ml alors qu'à 40‰, elle augmente pour passer de 10 à 17 ng/ml. La quantification de l'expérience à 35‰ n'a pas encore été effectuée lors de la rédaction de ce présent rapport.

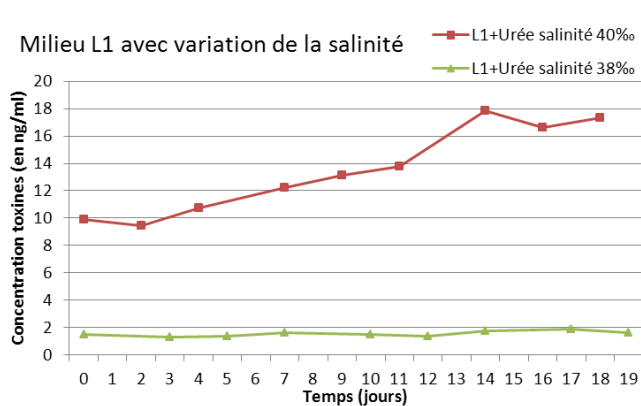
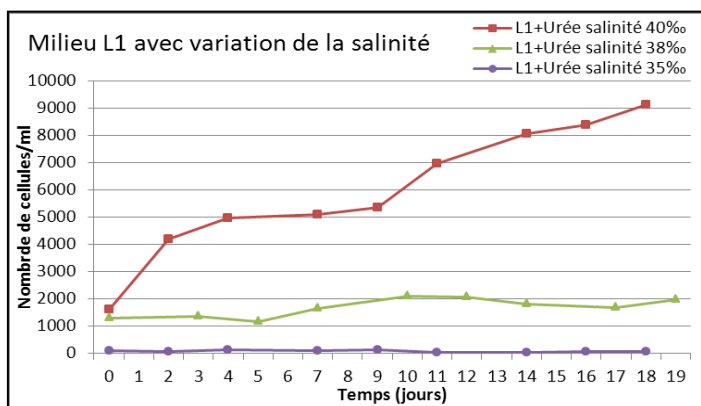


Figure 6 : Courbes de croissance cellulaire (cellules/ml) et de production de toxines (ng/ml) avec variation de la salinité.

Discussion

La principale différence entre les trois milieux de base est la concentration en Na_2EDTA , $2\text{H}_2\text{O}$. En effet, le milieu K en est plus concentré que les milieux L1 et f/2 d'où son utilisation préférentielle pour la culture des espèces du large par rapport aux espèces côtières qui pousseront mieux avec du L1 et du f/2. Ce composé se lie aux éléments traces présents dans l'eau et évite ainsi leurs précipitations entre eux, cette action fait du milieu K un milieu pauvre en comparaison aux deux autres. L'étude présentée dans ce rapport ne peut être comparée à la littérature existante puisque les mécanismes de l'algue n'ont pas été détaillés de pas son identification récente.

Les résultats de l'expérience sur les trois milieux de base montrent que les taux de croissance sont similaires alors que la quantité maximale de cellules diffère. Ainsi, on peut noter que la concentration en Na_2EDTA , $2\text{H}_2\text{O}$, autrement dit la richesse du milieu, n'influence pas le développement de ces organismes malgré une meilleure croissance pour les milieux K et f/2. De plus, on voit que la toxicité est plus forte pour les milieux K et f/2 en plus de l'absence d'un plateau de stabilisation. On peut donc en déduire que, les milieux K et f/2 sont plus appropriés pour la culture en laboratoire et l'étude sur la production de toxines de cette algue. Cependant, de par la difficulté rencontrée lors de l'expérimentation avec l'action de précipitation, le milieu K est écarté du reste de l'étude.

Les tests, des milieux L1 et f/2 en présence d'urée ont permis de voir l'effet de cette source d'azote sur la capacité de l'algue à rester dans la colonne d'eau. Ainsi, pour le milieu L1, on voit que la croissance a une meilleure progression avec 3 g/l d'urée puisqu'après une augmentation forte au début de l'expérience on note une hausse de la quantité de cellules sans observer de plateau. Alors qu'avec 3,5 g/l d'urée, on remarque une stabilisation du nombre de cellules inférieur à celle du milieu avec 3 g/l d'urée. Ce choix est confirmé par la production de toxines qui est légèrement plus élevée pour le test avec 3 g/l. Pour le milieu f/2, la croissance cellulaire stagne rapidement avec les deux concentrations d'urée malgré la différence de densité de population. Cependant, la production de toxines est moins grande pour le milieu f/2 avec 3 g/l qu'avec 3,5 g/l d'urée. Le milieu f/2 permet donc l'obtention d'une bonne récolte d'organismes mais n'est pas le plus favorable pour l'analyse des effets environnementaux sur la synthèse toxinique. En effet, en absence d'urée, les cellules s'agrègent dans un mucus de thèques celluloses qui adhère aux parois des flacons de culture. En présence d'urée, non seulement, il y a une bonne croissance cellulaire et production de pinnatoxine G, mais l'observation et donc le comptage est plus aisé puisqu'il y

a peu de mucus et que les cellules sont isolées. Ainsi, c'est grâce à ces tests préliminaires que le milieu L1 avec 3 g/l d'urée a été sélectionné.

Pour l'étude avec la variation de la température, on constate qu'une température de 22°C est plus favorable à la croissance que 25°C. En effet, les courbes de croissance cellulaire et de concentration de toxines sont significativement plus élevées à 22°C en plus d'une courbe stable et sans progression pour la culture à 25°C. Ceci correspond à la température de l'eau durant le printemps avant les grosses chaleurs de l'été. De plus, cette algue n'est pas endémique de la région méditerranéenne puisqu'elle a été retrouvée en Nouvelle-Zélande, au Japon et au Canada, zone où l'eau peut être froide ou chaude selon la saison et la localisation de la colonie.

Pour l'étude avec la variation de la salinité, on constate qu'une forte concentration en sels est appréciée par l'algue puisqu'elle cultive mieux avec une salinité de 40‰ que 38 ou 35‰ en plus d'une meilleure production de toxines. Ainsi, on peut constater que cet organisme s'est bien acclimaté à la croissance en milieu lagunaire méditerranéen puisque durant la saison estivale, l'évaporation induit une hausse de la salinité des eaux en plus de la température.

Conclusion

Cette étude a permis de réaliser les premières séries d'expériences sur la culture en laboratoire de cette algue. Ainsi, il a été démontré qu'une culture en milieu L1 avec 3 g/l d'urée fournissait un milieu de base adéquat pour le reste de l'étude. De plus, on constate que cette algue se cultive mieux à 22°C et avec une salinité de 40‰ en laboratoire mais n'est pas exigeante puisqu'on la détecte aussi bien dans les lagunes méditerranéenne que les récifs coralliens de Nouvelle-Zélande et Japonais ainsi que sur les côtes atlantiques canadiennes.

Des tests avec une température de 18°C, de 29°C ou une salinité de 32‰, mais aussi une variation du cycle de lumière (14;10 Jour;Nuit, 12;12 J;N, 18;6 J;N) devraient être entrepris par la suite. La mise en place d'une expérimentation sur la possibilité d'étude de la synthèse préférentielle de toxines par les cellules prises dans mucus ou non (Rhodes *et al.* 2011) peut être envisagée. Ils permettront ainsi de visualiser les conditions environnementales qui favorisent l'apparition de la prolifération de ces algues.

Bibliographie

- Guillard R.R.L, Ryther J.H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* 8, 229-39.
- Guillard R.R.L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith W.L., Chanley M.H. eds. *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, New York, pp. 26-60
- Guillard R.R.L. Hargraves P.E. (1993). *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycologia* 32, 234-36.
- Keller M.D., Selvin R.C., Claus W. Guillard R.R.L. (1987). Media for the culture of oceanic ultraphytoplankton. *J. Phycol.* 23, 633-9
- Nézan E., Chomerat N. (2011). *Vulcanodinium rugosum* gen. et sp. Nov. (Dinophyceae), un nouveau dinoflagellé marin de la côte méditerranéenne française. *Cryptogamie, Algologie* 32, 3-18.
- Rhodes L., Smith K., Selwood A., McNabb P., Van Ginkel R., Holland P., Munday R. (2010). Production of pinnatoxins by a peridionoid dinoflagellate isolated from Northland, New Zealand. *Harmful algae* 9, 384-389.
- Rhodes L., Smith K., Selwood A., McNabb P., Munday R., Shoichiro S., Sam M., Gustaaf H. (2011). Dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum* identified as the causative organism of pinnatoxins in Australia, New Zealand and Japan. *Phycologia* 50, 624-628.

ANNEXE 1

Dinoflagellé: Famille de micro-algues marines hétérotrophes, mixotrophes ou capables de photosynthèse. Elle possède une grande variété de de morphologie avec la présence d'épines ou de cornes pour pouvoir se stabiliser dans la colonne d'eau ou éperonner leurs proies. Elles sont aussi constituées d'une paroi de thèques et de deux flagelles. Certaines espèces sont productrices de toxines et sont responsables d'efflorescences soudaines pouvant induire des pathologies en cas d'ingestion.

Thèque: Ensemble de plaque cellulosique recouvrant certaines algues et leurs conférant la protection d'une paroi.

Pinnatoxines: Toxines algales impliquées dans des pathologies lors d'essais biologiques, comportant un cycle imine avec différents radicaux formant ainsi une famille toxique.

Sénescence: Phase de vieillissement et de mortalité d'une culture cellulaire après une période de croissance stable.

ANNEXE 2

Composant	Milieu K	Concentration
	nitrate de sodium (NaNO ₃)	8,82x10 ⁻⁴ M
	chlorure d'ammonium (NH ₄ Cl)	5x10 ⁻⁵ M
	Na-b glycérophosphate	1x10 ⁻⁵ M
	acide de sélénium (H ₂ SeO ₃)	1x10 ⁻⁸ M
	tris-base à pH 7.2	1x10 ⁻³ M
Solution d'éléments traces	Na ₂ EDTA, 2H ₂ O	1,11x10 ⁻⁴ M
	chlorure de fer (FeCl ₃ , 6H ₂ O)	1,17x10 ⁻⁵ M
	chlorure de manganèse (MnCl ₂ , 4H ₂ O)	9x10 ⁻⁷ M
	sulfate de zinc (ZnSO ₄ , 7H ₂ O)	8x10 ⁻⁸ M
	chlorure de cobalt (CoCl ₂ , 6H ₂ O)	5x10 ⁻⁸ M
	molybdate de sodium (Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O)	2,60x10 ⁻⁸ M
solution vitaminique	sulfate de cuivre (CuSO ₄ , 5H ₂ O)	1x10 ⁻⁸ M
	thiamine (vit. B1)	2,96x10 ⁻⁷ M
	biotine (vit. H)	2,05x10 ⁻⁹ M
	cyanocobalamine (vit. B12)	3,69x10 ⁻¹⁰ M

Composant	Milieu L1	Concentration
	nitrate de sodium (NaNO ₃)	8,82x10 ⁻⁴ M
	dihydrogenophosphate de sodium (NaH ₂ PO ₄)	3,62x10 ⁻⁵ M
Solution d'éléments traces	Na ₂ EDTA, 2H ₂ O	1,17x10 ⁻⁵ M
	chlorure de fer (FeCl ₃ , 6H ₂ O)	1,17x10 ⁻⁵ M
	chlorure de manganèse (MnCl ₂ , 4H ₂ O)	9,09x10 ⁻⁷ M
	sulfate de zinc (ZnSO ₄ , 7H ₂ O)	8x10 ⁻⁸ M
	chlorure de cobalt (CoCl ₂ , 6H ₂ O)	5x10 ⁻⁸ M
	molybdate de sodium (Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O)	8,22x10 ⁻⁸ M
	sulfate de cuivre (CuSO ₄ , 5H ₂ O)	1x10 ⁻⁸ M
	acide de sélénium (H ₂ SeO ₃)	1x10 ⁻⁸ M
	sulfate de nickel (NiSO ₄ , 6H ₂ O)	1x10 ⁻⁸ M
	orhovanadate de sodium (Na ₃ VO ₄)	1x10 ⁻⁸ M
solution vitaminique	chromate de potassium (K ₂ CrO ₄)	1x10 ⁻⁸ M
	thiamine (vit. B1)	2,96x10 ⁻⁷ M
	biotine (vit. H)	2,05x10 ⁻⁹ M
	cyanocobalamine (vit. B12)	3,69x10 ⁻¹⁰ M

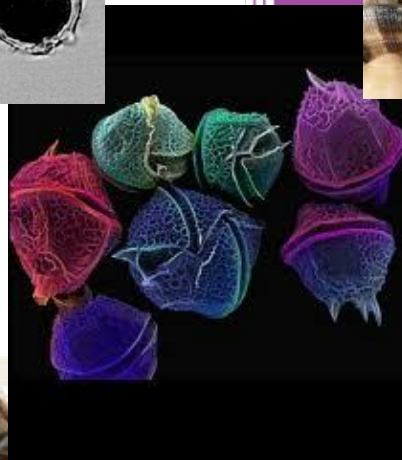
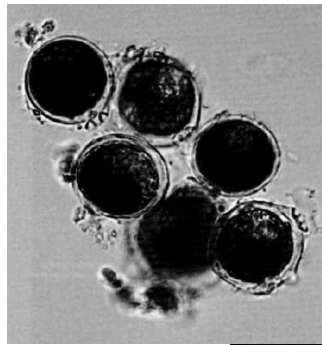
Composant	Milieu f/2	Concentration
	nitrate de sodium (NaNO ₃)	8,82x10 ⁻⁴ M
	dihydrogenophosphate de sodium (NaH ₂ PO ₄)	3,62x10 ⁻⁵ M
Solution d'éléments traces	Na ₂ EDTA, 2H ₂ O	1,17x10 ⁻⁵ M
	chlorure de fer (FeCl ₃ , 6H ₂ O)	1,17x10 ⁻⁵ M
	chlorure de manganèse (MnCl ₂ , 4H ₂ O)	9,10x10 ⁻⁷ M
	sulfate de zinc (ZnSO ₄ , 7H ₂ O)	7,65x10 ⁻⁸ M
	chlorure de cobalt (CoCl ₂ , 6H ₂ O)	4,20x10 ⁻⁸ M
	molybdate de sodium (Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O)	2,60x10 ⁻⁸ M
solution vitaminique	sulfate de cuivre (CuSO ₄ , 5H ₂ O)	3,93x10 ⁻⁸ M
	thiamine (vit. B1)	2,96x10 ⁻⁷ M
	biotine (vit. H)	2,05x10 ⁻⁹ M
	cyanocobalamine (vit. B12)	3,69x10 ⁻¹⁰ M

Annexe 4 : Rapport sur l'étude toxicologique (ANSES Fougères)



Rapport de stage :

Etude de la toxicité des pinnatoxines et d'extraits de culture de *Vulcanodinium rugosum* sur une sélection de cellules en culture



Desanglois Gwenaëlle

Année 2011-2012

Master 2 Toxicologie alimentaire et réglementaire

Laboratoire ANSES Fougères

Partenaire : IFREMER Nantes/CNRS

Maitre de stage : Valérie Fessard



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Pascal Sanders, directeur du laboratoire Anses de Fougères, pour m'avoir permis de réaliser mon stage au sein de son établissement.

Je remercie mon maître de stage et responsable de l'unité Toxicologie des contaminants : Valérie Fessard pour m'avoir accueillie et encouragée tout au long de ce stage.

Je tiens également à remercier Pierre-Jean et Rachelle et sa main verte pour m'avoir accordé beaucoup de leur temps, pour leur investissement et leur bonne humeur, Adeline pour son écoute, Manuel pour son humour et Pamela. Merci à vous cinq d'avoir si bien intégré les stagiaires, d'ailleurs, merci à David et Sylvain pour leur soutien inter stagiaires.

Merci également à Kevin Hogeveen pour avoir partagé sa connaissance du High Content Screening, Jérôme Henri pour son aide précieuse pour la cinétique, à toute l'unité de toxicologie des contaminants (Antoine, Ludo, Gérard, Natsuko, Sylvie, Annick et Martine) pour leur disponibilité et leur gentillesse.

Merci à Philipp Hess pour avoir pu fournir les divers échantillons, pour son suivi du projet, et pour m'avoir fait découvrir les locaux d'IFREMER Nantes.

Merci à toute l'équipe de Jordi Molgo du CNRS de Gif-sur-Yvette et surtout Romulo Araoz pour sa bienveillance, son attention et pour l'aide qu'il m'a fourni, ainsi qu'Evelyne pour l'énergie positive qu'elle renvoie.

Merci à tous ceux qui ont rendu ces 6 mois agréables et fait de cette expérience professionnelle une aventure humaine très enrichissante.

Liste des abréviations

AC : Anti-corps

ANSES : Agence Nationale de Sécurité sanitaire de l'alimentation de l'environnement et du travail

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

AFSSET : Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail

ARfD : Acute Reference Dose

BSA : Bovine Serum Albumin

CI50 : Concentration Inhibitrice 50%

CV : Coefficient de Variation

DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole

DJT : Dose Journalière Tolérable

DL50 : Dose létale 50%

DO : Densité Optique

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique.

ELISA : Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay

FATs : Fast Acting Toxins

H2AX-y : H2AX phosphorylé

HBSS : Hank's Buffered Salt Solution

HCS : High Content Screening

HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

IAFM : Intoxication Amnésiante par les Fruits de Mer

IDFM : Intoxication Diarrhéique par les Fruits de Mer

IPFM : Intoxication Paralysante par les Fruits de Mer

IFREMER : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer

LC-MS : Liquid chromatography–mass spectrometry

LOAEL : Lowest Observed Adverse Effect Level

LOD : Limite de Détection

MBA : MouseBioAssay

MEM : Milieu Essentiel Minimum

MeOH : Méthanol

MTT : Méthyle Tétrazolium

PBS : Phosphate Buffered Saline

PFA : Paraformaldéhyde

PnTx : Pinnatoxine

REACH : Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of Chemicals

REPHY : Réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines

RnACh : Récepteurs nicotiniques de l'ACétylcholine

RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium

SD : Déviation Standard

SVF : Sérum de Veau Foetal

TA : Température Ambiante

TEER : Trans Epithelial Electric Resistance

Table des matières

L'ANSES.....	1
INTRODUCTION.....	3
I- LES PHYCOTOXINES.....	3
A. GENERALITES.....	3
B. LES PINNATOXINES.....	4
II- SURVEILLANCE ET REGLEMENTATION DES ESPECES PHYTOPLANCTONIQUES.....	7
A. MESURES.....	7
B. METHODES DE DETECTION.....	8
III- OBJECTIFS.....	11
MATERIELS ET METHODES.....	12
I. MATERIELS.....	12
A. LIGNEES CELLULAIRES.....	12
B. ENTRETIEN ET REPIQUAGE DES LIGNEES CACO-2 ET NEURO2A.....	12
C. EXTRAIT ET FRACTIONS TESTES.....	13
II. TESTS DE CYTOTOXICITE.....	14
A. ENSEMENCEMENT DES CELLULES (T0).....	14
B. TRAITEMENT DES CELLULES (T24H).....	14
C. TEST MTT.....	14
D. ANALYSE DES DONNEES.....	15
III. TEST ELISA.....	15
A. TECHNIQUE.....	15
B. ANALYSE DES DONNEES.....	16
IV. IMMUNOMARQUAGE.....	17
A. PRINQPE.....	17
B. ENSEMENCEMENT ET TRAITEMENT.....	17
C. MARQUAGE.....	17
D. ANALYSE DES DONNEES.....	18
IV. MESURE DE LA TEER ET DOSAGE DE LA PNTX-G.....	18
A. PRINQPE.....	18
B. MATERIEL.....	19
C. ENSEMENCEMENT DES CELLULES (T0).....	19
D. TRAITEMENT DES CELLULES.....	19

E. MESURE DE LA TEER ET RECUPERATION DES ECHANTILLONS POUR LE DOSAGE.....	20
<u>RESULTATS</u>	21
I. TESTS DE CYTOTOXICITE	21
II. MESURE DE L'INFLAMMATION	31
III. HIGH CONTENT SCREENING	32
IV. MESURE DE LA TEER	34
V. PASSAGE DE LA PNTX-G AU TRAVERS DE LA BARRIERE INTESTINALE <i>IN VITRO</i>	36
<u>DISCUSSION</u>	38
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	43
<u>ANNEXES</u>	47

L'ANSES

L'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) est un établissement public à caractère administratif placé sous la tutelle des ministères chargés de la santé, de l'agriculture, de l'environnement, du travail et de la consommation.

Elle a été créée le 1^{er} juillet 2010 par la fusion de deux agences sanitaires françaises : l'AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) et l'AFSSET (Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail). C'est la plus grande agence de sécurité sanitaire en Europe par son champ de compétence. Elle assure des missions de veille, d'expertise, de recherche et de référence couvrant la santé humaine, la santé et le bien-être animal, et la santé végétale. Elle appréhende ainsi les expositions et les effets auxquels l'Homme peut être soumis à travers ses modes de vie et de consommation ou les caractéristiques de son environnement, assurant ainsi la sécurité des travailleurs et des consommateurs.

Basée sur le principe de la séparation entre l'évaluation et la gestion des risques, elle informe les autorités compétentes, répond à leurs demandes d'expertise et les alerte en cas de crise sanitaire. L'Anses assure ou contribue à l'évaluation des médicaments vétérinaires, des pesticides et des biocides avant leur mise sur le marché, ainsi que celle des produits chimiques dans le cadre de la réglementation REACH.

L'Agence dispose d'un réseau de 12 laboratoires de référence et de recherche dont le laboratoire de Fougères.



Ce laboratoire, qui réunit 65 personnes, contribue principalement à une meilleure connaissance des bénéfices et des risques associés à l'utilisation des médicaments vétérinaires et des désinfectants par la filière agro-alimentaire, mais également des risques associés aux contaminants alimentaires. Il concentre ses travaux sur le dépistage des résidus de médicaments vétérinaires dans les denrées d'origine animale, l'efficacité antimicrobienne des antibiotiques et des désinfectants, la résistance à ces produits ainsi que l'évaluation de la toxicité des contaminants alimentaires. Par ses travaux de recherche en toxicologie, il apporte des données nécessaires aux processus d'évaluation des risques de contaminants et de résidus dans l'alimentation.

Il comporte 4 unités de recherche : l'unité résidus de médicaments vétérinaires, l'unité pharmacocinétique-pharmacodynamie, l'unité produits d'hygiène antimicrobiens, et enfin l'unité toxicologie des contaminants.

La caractérisation du danger est la principale mission de l'unité de toxicologie des contaminants. Cette unité est aussi chargée de la conception et de la validation de nouveaux outils permettant de prédire leur toxicité.

Le laboratoire de Fougères est accrédité par le Cofrac pour certaines de ses activités.



Introduction

I- Les phycotoxines

A. Généralités

Les phycotoxines (du grec *phyco* = algues) sont des substances naturelles toxiques produites un peu partout dans le monde, sous certaines conditions de lumière, de salinité et de température, par différentes espèces d'algues unicellulaires des eaux marines (figure 1), (Ifremer, 2008). Ces micro-algues font partie du phytoplancton, premier maillon de la chaîne alimentaire aquatique, qui constitue la principale source d'alimentation pour les mollusques filtreurs ou certains poissons. Ces derniers peuvent donc concentrer une grande quantité de toxines dans leur tractus digestif qui peut s'accumuler ensuite après absorption (Botana et coll., 2009). Certaines d'entre elles peuvent provoquer une mortalité importante de la faune présentant alors un risque pour l'environnement mais elles sont surtout connues pour les risques encourus pour l'homme qui consomme ces bivalves ou poissons (annexe 1). Pour limiter ces risques, les productions marines peuvent être interdites de commercialisation suite à une contamination par des toxines amenant une crainte économique chez les producteurs de coquillages. Plus de 60 000 incidents toxicologiques sur l'homme par an dans le monde sont dus aux toxines algales marines et son phytoplancton associé (Bourne et coll., 2010).

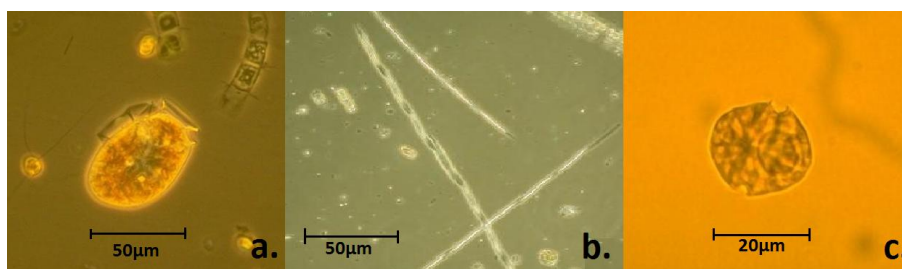


Figure 1 : Les principaux genres phytoplanctoniques producteurs de trois classes de phycotoxines a) *Dinophysis* b) *Pseudo-nitzschia* c) *Alexandrium* - source : Ifremer

Selon leurs effets sur le consommateur, on distingue plusieurs familles de phycotoxines s'accumulant dans les mollusques. Les toxines lipophiles incluent les toxines diarrhéiques comme l'acide okadaïque et les azaspiracides, ainsi que les neurotoxines à action rapide ou FATs (Fast Acting Toxins) parmi lesquelles sont classées les spirolides, les gymnodimines, les pinnatoxines ou encore les

ptériatoxines. Certaines de ces toxines sont associées à l'Intoxication Diarrhémique par les Fruits de Mer (IDFM) Il existe également la famille des toxines paralysantes comprenant la saxitoxine et ses congénères impliquées dans l'Intoxication Paralysante par les Fruits de Mer (IPFM); et enfin les toxines amnésiantes avec l'acide domoïque impliquées dans l'Intoxication Amnésiante par les Fruits de Mer (IAFM).

La dissémination des espèces phytoplanctoniques peut être très rapide via les eaux de ballast des navires et les multiples échanges de mollusques vivants entre différents pays ou régions (Hallegraeff et Bolch, 1991). De plus, la liste de phycotoxines présentes dans les mollusques n'a cessé d'augmenter, ainsi que la liste des espèces algales impliquées dans ces toxicités (Ifremer, 2006). Sur 4000 espèces phytoplanctoniques répertoriées, environ 70 produisent des toxines.

Parmi les nouvelles toxines, on retrouve les pinnatoxines (PnTX).

B. Les Pinnatoxines

1. Origine

Les pinnatoxines sont des neurotoxines à action rapide appartenant au groupe des imines cycliques comprenant également les spirolides, les gymnodimines, les ptériatoxines et les prococontrolides (EFSA, 2010). Elles ont été découvertes dans les années 90 en Chine et au Japon dans des extraits de glandes digestives du bivalve *Pinna attenuata*, utilisé régulièrement par les Chinois et les Japonais pour les sushis (Chou et coll., 1996 ; Otero et coll., 2011). Plus récemment, en 2010, elles ont été trouvées en Europe dans des bivalves au niveau des côtes de Norvège mais également au Canada, au Danemark, en Nouvelle Zélande, en Ecosse, en Tunisie ou aux USA (Rundberget et coll., 2011).

Un dinoflagellé appartenant à l'ordre des Péridiniales a récemment été identifié en Australie et au Japon comme l'organisme producteur de pinnatoxines (figure 2), (Rhodes et coll., Smith et coll., 2011). En France, il a été retrouvé sur plusieurs sites le long de la côte méditerranéenne en 1996, 2001 et 2009 puis isolé et nommé « *Vulcanodinium rugosum* » par l'équipe de l'Ifremer (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer). Bien que sa toxicité soit suspectée, elle reste à démontrer (Nézan et Chomérat, 2011).

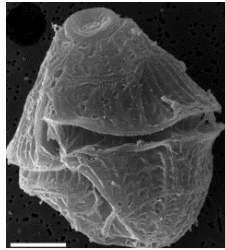


Figure 2 : *Vulcanodinium rugosum*. Echelle : 10 μ m - Source : Nézan et Chomérat, 2012.

Différentes pinnatoxines ont été identifiées (annexe 2). La pinnatoxine A est un composé amphotérique, soluble dans l'eau. Les pinnatoxines B, C, et D, isolées de *Pinna muricata*, seraient les congénères les plus toxiques. Les pinnatoxines E, F, et G n'ont été isolées que très récemment chez les huîtres et le poisson rasoir (Otero et coll., 2011). La pinnatoxine G donnerait les pinnatoxines A, B, C ou intermédiaires, ainsi que les ptériatoxines A, B et C après transformation métabolique et hydrolytique dans le coquillage (Selwood et coll., 2010 ; EFSA, 2010). Des concentrations en PnTx-G supérieures à 2 μ g/g de glande digestive ont été retrouvées dans des moules de l'étang d'Ingril en Languedoc Roussillon (Ifremer, 2011).

2. Propriétés physico-chimiques et mécanisme d'action

Ces toxines ont une bonne stabilité chimique. Elles sont lipophiles et très peu volatiles. Leur synthèse chimique est très complexe (Stivala et Zakarian, 2007) et l'étude du mécanisme d'action est difficile du fait de la faible quantité de toxines disponible. Les pinnatoxines sont connues pour agir en puissants antagonistes sur les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (RnACh), comme les autres membres du groupe des imines cycliques (Bourne et coll., 2010 ; Araoz et coll., 2011). Une étude *in vitro* a montré un blocage de la transmission neuromusculaire par les PnTx E et F, suggérant un antagonisme sélectif des récepteurs musculaires nicotiques de l'acétylcholine (figure 3), (Hellyer et coll., 2011). L'absence de réponse à une stimulation directe indique qu'il peut exister d'autres cibles impliquées dans les contractions musculaires. Les PnTx pourraient ainsi former des liaisons au niveau d'autres sites que le récepteur à l'acétylcholine et modulerait alors de façon allostérique ce récepteur (Hellyer et coll., 2011).

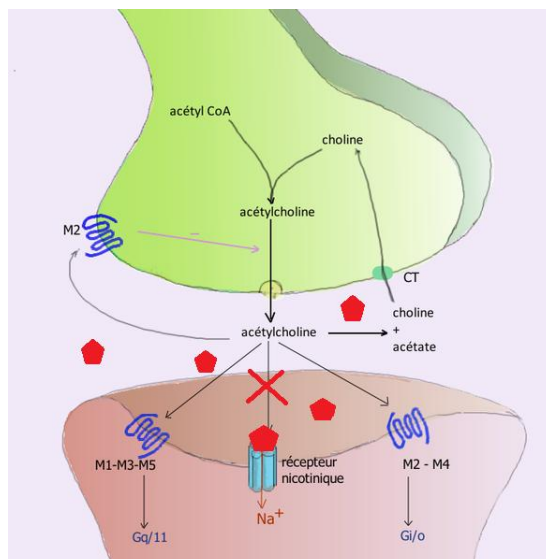


Figure 3 : Action des PnTx sur le récepteur nicotinique de la jonction neuromusculaire .

3. Toxicité et réglementation

Après administration intrapéritonéale de pinnatoxines E et F à des souris, une cascade de symptômes neurologiques apparaît avec mort après 20 minutes, ou récupération complète sans aucune séquelle apparente. On assiste à un phénomène de tout ou rien (Otero et coll., 2011). Aux doses létales, la mort est provoquée en quelques minutes par une paralysie respiratoire, comme avec d'autres imines cycliques (Selwood et coll., 2010).

La DL50 chez la souris de la pinnatoxine G par injection intrapéritonéale est de 50 µg/kg (EFSA, 2010). Les études indiquent que la toxicité des pinnatoxines est similaire entre une administration orale et une administration intrapéritonéale suggérant un passage très aisé de la barrière intestinale. Il est donc possible de retrouver d'importantes quantités de toxine dans la circulation systémique compte tenu des quantités élevées retrouvées dans les coquillages.

Aucune étude à long terme n'a été effectuée en raison du manque de disponibilité en toxine.

Aucun phénomène d'intoxication sur l'homme dû aux PnTx n'a été observé. Bien qu'elles aient été impliquées dans un épisode d'intoxication en Chine, le rôle de ces toxines n'a pas pu être démontré car leur présence dans les coquillages n'a pas été clairement établie (Uemura et coll., 1995, Mc Nabb et coll., 2012). De plus, en Nouvelle Zélande, aucune pathologie n'a été trouvée suite à la consommation

d'huîtres contaminées par les pinnatoxines E, F et G à des concentrations allant jusqu'à 130µg/kg de chair (Mc Nabb et coll., 2012).

Compte tenu des données éparses sur la toxicité, aucune Acute Reference Dose (ArfD) ni aucune Dose Journalière Tolérable (DJT) n'ont pu être établies (EFSA, 2010).

II- Surveillance et réglementation des espèces phytoplanctoniques

A. Mesures

La prolifération des espèces de micro algues ne pouvant être contrôlée, les autorités compétentes ont établi des plans de surveillance et mis en place des mesures de gestion selon les données disponibles afin de prévenir le consommateur d'une exposition aux phycotoxines.

Dans l'Union Européenne, la présence des phycotoxines dans les coquillages vivants est réglementée depuis 1991 par la Directive du Conseil 91/492/CEE qui fixe les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché de ces organismes marins. Cette directive impose une surveillance des espèces phytoplanctoniques toxiques dans les eaux de production et un contrôle des niveaux de phycotoxines dans les coquillages. Des seuils de salubrité réglementaires pour les phycotoxines réglementées ont également été fixés dans le règlement 854/2004. Le règlement CE 2074/2005 précise lui les méthodes de détection pour chaque famille de phycotoxines. Il faut souligner qu'en France, depuis 2010, le bio-essai souris pour la surveillance et le contrôle des toxines lipophiles a été remplacé par des méthodes de détection physico-chimique. Un système de vigilance a également été mis en place au sein duquel seuls quelques points du littoral sont surveillés pour la détection de toxicité dans les coquillages à l'aide du bio-essai souris (1 fois par mois pendant les périodes à risque).

Le réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines (REPHY) a été mis en place par l'Ifremer en 1984 afin d'observer les espèces phytoplanctoniques présentes dans le milieu marin côtier et de suivre les épisodes de toxicité associés à certaines espèces. (Ifremer, 2008).

L'Ifremer et l'ANSES contribuent également au contrôle des biotoxines marines dans les coquillages, le premier s'attachant aux zones de production et le second étant impliqué dans le contrôle des coquillages sous forme denrée, au moment de leur mise sur le marché.

B. Méthodes de détection

Deux méthodes principales, l'une biologique, l'autre physico-chimique, sont utilisées pour la détection des phycotoxines lipophiles. La méthode biologique repose sur le bio-essai souris (MouseBioAssay ou MBA). Elle consiste en une injection intrapéritonéale d'un extrait de mollusques à trois souris. Si deux des trois souris meurent au bout de 24h, le test est positif. Si aucune ou seulement l'une d'entre elles meurt, le test est négatif. Ce test permet de détecter de nombreuses toxines, néanmoins, il pose des problèmes d'interprétation comme méthode de surveillance. En effet, il manque de reproductibilité et de sensibilité. De plus, des interférences dues à la matrice ou à d'autres contaminants peuvent conduire à des faux positifs ou des faux négatifs. Enfin, il pose des problèmes d'éthique (Botana et coll., 2009).

L'autre méthode physico-chimique se base sur l'utilisation de la LC-MS (Liquid Chromatography–Mass Spectrometry). Elle permet l'identification et la quantification de toxines au sein d'échantillons avec une sensibilité et une spécificité élevées (Draisci et coll., 1999). Les limites de détection (LOD) sont majoritairement plus basses que celles d'autres méthodes (ainsi, pour les PnTx la LOD est de 5µg) (EFSA, 2010). Néanmoins la détection de nouveaux analogues de toxines connues et de nouvelles toxines est délicate en raison du manque de molécules standards.

Aussi, dans le cas de toxicité atypique, c'est-à-dire si le test souris s'avère positif alors qu'aucune toxine n'est détectée en LC-MS en quantité suffisante pour expliquer cette mortalité, les méthodes précédentes doivent être complétées par d'autres approches. Dans ce cadre, les modèles cellulaires constituent une option prometteuse permettant d'étudier l'activité de substances toxiques dans des conditions expérimentales contrôlées. Par ailleurs, les expériences peuvent rester assez simples et être aisément multipliées afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables. Ces modèles permettent aussi d'acquérir des connaissances sur des phénomènes biologiques qui étaient accessibles par le bio-essai souris mais qui ne le sont plus par les analyses physico-chimiques. Notamment, les cibles biologiques

et les mécanismes d'action à l'échelle cellulaire des toxines peuvent être investigués. Ainsi, l'utilisation d'une batterie de modèles cellulaires peut permettre d'orienter sur le type de toxicité.

Une telle batterie de tests cellulaires a été utilisée dans le programme national Arcachon. Le but était de développer des outils permettant d'identifier les agents toxiques impliqués dans les mortalités de souris survenues dans le cadre de la surveillance des toxines lipophiles dans le bassin d'Arcachon (Ledreux et coll., Sérandour et coll., 2012). Cette méthodologie devrait pouvoir s'appliquer ensuite à d'autres épisodes de toxicité atypique.

Les modèles cellulaires qui ont été utilisés au cours de ce programme représentent des organes cibles pour les phycotoxines comme l'intestin et le système nerveux. En effet, des symptômes gastro-intestinaux sont observés avec certaines toxines lipophiles. De plus, l'intestin est l'un des premiers organes en contact avec les contaminants alimentaires. Ainsi, d'importantes concentrations en contaminants peuvent y être retrouvées. Cet organe est d'autant plus important qu'il régule la distribution et la concentration systémique des contaminants par le système d'absorption. Par ailleurs, certains symptômes neurologiques ont également été observés avec des neurotoxines comme les saxitoxines et les brevétoxines ou avec les FATs au cours du bio-essai souris (Botana et coll., 2009 ; EFSA, 2010).

Le modèle intestinal retenu, les cellules Caco-2, sont des cellules adhérentes issues d'un adénocarcinome de côlon humain, isolées dans les années 70. Elles possèdent la capacité de se différencier spontanément *in vitro* en cellules ayant les caractéristiques fonctionnelles et morphologiques proches de celles des cellules absorbantes de l'intestin grêle, les entérocytes. Elles miment donc les fonctions de l'épithélium intestinal. De plus, ce modèle a été largement utilisé pour déterminer les processus et les cinétiques d'absorption au travers de la barrière intestinale (Sun et coll., 2008).

La lignée cellulaire Neuro2A est une lignée de neuroblastomes de souris. Ce sont des cellules transformées mais qui gardent les caractéristiques associées aux neurones. Cette lignée a été largement utilisée pour la détection de neurotoxines (Ledreux et coll., 2009).

Différentes réponses des modèles cellulaires peuvent être étudiées. Tout d'abord, la cytotoxicité peut être évaluée par des tests dits « globaux » qui mesurent

la prolifération et la viabilité cellulaire. Ils sont peu spécifiques. Parmi ceux-ci, les plus utilisés sont le test du rouge neutre mesurant l'incorporation du rouge neutre dans les lysosomes, le test MTT qui consiste à mesurer le taux de cristaux de formazan formés à partir du MTT (méthyle tétrazolium) par la succinate deshydrogénase au niveau mitochondrial, ainsi que la mesure de la dégradation de la résazurine (Alamar Blue) dans les cellules viables (Hamid et coll., 2004 ; Fotakis et Timbell, 2006). Des données supplémentaires sur des altérations plus spécifiques peuvent également être acquises : modifications du noyau, réarrangements du cytosquelette, potentiel mitochondrial ou apoptose. Récemment des techniques d'imagerie à haut débit comme le « High Content Screening » ont été appliquées pour la quantification de ces effets. Grâce à la méthode d'immunofluorescence utilisant la capacité d'un antigène à se fixer sur une molécule cible et d'émettre une fluorescence, cette technologie permet de mesurer plusieurs paramètres simultanément sur des systèmes miniaturisés et d'accéder ainsi à la recherche d'effets à moyen voir haut débit au niveau cellulaire (Giuliano et coll., 1997).

En effet, l'inflammation est un des symptômes des troubles gastro intestinaux associés à certaines toxines. Par exemple l'acide okadaïque augmente très fortement la production d'interleukines (Sonoda et coll., 1997). L'inflammation peut également être associée au cancer (Coussens et Werb, 2002). L'effet inflammatoire peut facilement être mesuré dans les milieux de culture par la technique ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) permettant de détecter la présence d'un anticorps ou d'un antigène dans un échantillon (Lequin, 2005).

La barrière intestinale est non seulement un des premiers tissus en contact avec les contaminants alimentaires mais elle régule aussi leur absorption. Les données toxicocinétiques du passage de cette barrière sont donc importantes pour l'évaluation du danger par ingestion. Dans le cas des phycotoxines, peu de données sont disponibles sur ce type de transfert bien qu'elles puissent aider à expliquer leur toxicité. Le modèle cellulaire Caco-2 a été beaucoup utilisé pour l'étude *in vitro* de l'absorption des xénobiotiques (Artursson et coll., 2001). En effet, après quelques semaines de culture, ces cellules présentent un phénotype différencié avec des caractéristiques morphologiques et biochimiques proches des entérocytes (Pinto et coll., 1983). De plus, diverses enzymes métaboliques et des transporteurs impliqués

dans le processus d'absorption sont présents dans ce modèle (Hilgendorf et coll., 2007; Sun et coll., 2008).

III- Objectifs

La toxicité de la PnTx-G pure, d'un extrait de culture du dinoflagellé *Vulcanodinium rugosum*, et de diverses fractions issues de cet extrait sera tout d'abord étudiée sur les deux lignées cellulaires sélectionnées (les cellules intestinales humaines Caco-2 et les neuroblastomes de souris Neuro2A) à l'aide d'un test de cytotoxicité (MTT). Sur les cellules intestinales, des mesures d'inflammation (par dosage ELISA), d'intégrité de l'épithélium intestinal (TEER ou Trans Epithelial Electric Resistance) et d'absorption seront également effectuées. Enfin les effets sur des réponses cellulaires plus spécifiques (cycle cellulaire, génotoxicité) seront recherchés par immunomarquage des cellules et quantifiés grâce à un appareillage de type High Content Screening.

Matériels et méthodes

I. Matériels

A. Lignées cellulaires

Les lignées choisies pour cette étude sont la lignée Caco-2 et la lignée Neuro2A (figure 4).

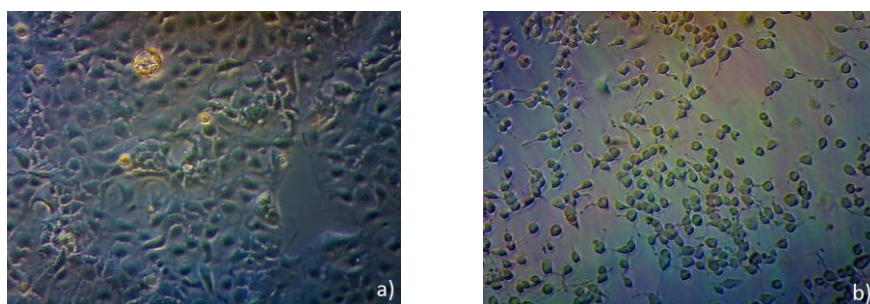


Figure 4 : Cellules Caco-2 (a) et Neuro2A (b) en culture X100

B. Entretien et repiquage des lignées Caco-2 et Neuro2A

Les cellules Caco-2 sont entretenues dans un milieu complet (milieu MEM (Milieu Essentiel Minimum) additionné d'antibiotiques (1%) et d'acides aminés non-essentiels (1%)) avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF). Le repiquage a lieu 2 fois par semaine. Pour cela, la culture est rincée avec du PBS (Phosphate Buffered Saline), puis 1mL de trypsine est ajouté. Après décollement des cellules, 9mL de milieu complet additionné de 10% de SVF sont ajoutés. Les cellules sont centrifugées 5 minutes à 136g, puisensemencées dans une flasque avec du milieu complet-SVF 10%. Le même protocole est appliqué aux cellules Neuro2A. Le milieu utilisé sera alors du RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) additionné d'antibiotiques (1%) et de sodium/pyruvate (1%)–SVF 10%. Les cellules seront décollées par aspiration et refoulement de 10mL de milieu et non pas par trypsination. Un mL des 10mL est prélevé et les cellules sontensemencées dans une flasque contenant 15mL de milieu.

Pour l'obtention de cellules Caco-2 différenciées, les cellules sontensemencées avec 50 000 cellules/puits (60 000 cellules/cm²) dans du milieu complet avec 10% de SVF en plaques 48 puits (Costar #3548) (200µL par puits). Le

milieu est changé 3 fois par semaine, les cellules atteignent la confluence après 3 jours et sont complètement différenciées en 21 jours (Natoli et coll., 2012).

C. Extrait et fractions testés

Un extrait brut d'une culture de *Vulcanodinium rugosum* isolé de l'étang d'Ingril par l'Ifremer et gardé en culture, 13 fractions du dinoflagellé ainsi que la pinnatoxine G pure seront testés. L'extrait brut a été partitionné entre du dichlorométhane et de l'eau (purification P1) puis entre de l'hexane et du méthanol (MeOH) aqueux (purification P2). Une séparation (purification P3) a été effectuée sur colonne de silice C8 pour obtenir les différentes fractions (F1P3 à F5P3) (figure 5). Après évaporation et pesée, la concentration de chacune des fractions a été ajustée dans du méthanol à 100µg de poids sec/mL. La fraction 3 de cette étape de purification, qui contient la pinnatoxine, a ensuite été fractionnée sur colonne de silice C8 en 6 fractions dénommées FxP4. Les échantillons fournis par l'IFREMER ont été filtrés préalablement sur membrane nylon de 0,2µm et stockés à -20°C. La toxine pure est également fournie par l'IFREMER. Sa concentration est de 2,14 µg/mL.

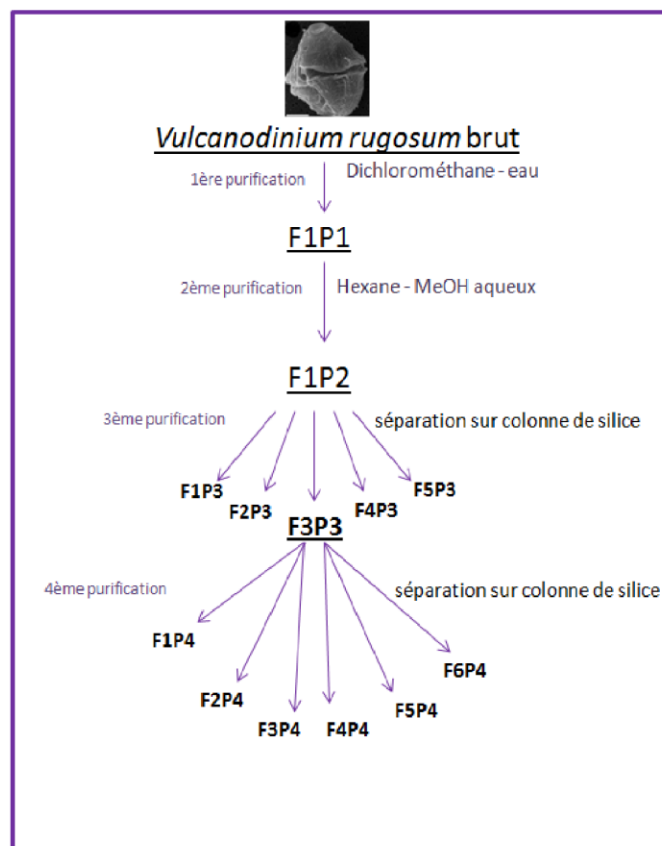


Figure 5 : Schéma de purification et de fractionnement d'une culture de *V. rugosum*

II. Tests de cytotoxicité

A. Ensemencement des cellules (T0)

Pour les tests sur cellules Caco-2 et Neuro2A non différenciées, les cellules sont ensemencées en plaque 96 puits (Costar #3596) à la densité de 15 000 cellules par puits (50 000 cellules/cm²) dans du milieu de culture additionné de 10% de SVF (100µL par puits). Les puits en pourtour de la plaque ne sont pas ensemencés afin d'éviter un éventuel effet bord. Pour chaque plaque, 2 réplicas minimum sont prévus par condition de traitement, ainsi qu'un témoin non traité (cellules en présence de milieu de culture), un témoin solvant (correspondant aux cellules exposées à la dose maximale de solvant utilisé), un témoin positif (acide okadaïque 1nM) et un blanc (puits sans cellules contenant du milieu de culture).

B. Traitement des cellules (T24h)

Les gammes de toxines sont préparées dans du milieu sans SVF à partir des solutions stock. Le solvant MeOH ne devra pas dépasser 5% du volume final en raison de la toxicité observée pour des concentrations plus élevées. Les concentrations maximales sont de 5µg/mL pour les fractions et l'extrait brut de *V. rugosum* et de 32ng/mL pour la PnTx-G pure. Des dilutions au ½ en cascade sont effectuées pour l'obtention des autres doses. La préparation des gammes de toxines se fait dans des plaques 96 ou 48 puits vides en suivant le plan de plaque élaboré au préalable. Pour les Caco-2 non différenciées et les Neuro2A, après 24h de subculture en plaque 96 puits, le milieu est éliminé par aspiration. Les cellules sont ensuite traitées par les toxines et incubées soit 24 heures pour les Neuro2A soit 24 et 48 heures pour les cellules Caco-2, à 37°C. Les Caco-2 différenciées en plaques 48 puits sont traitées 21 jours après ensemencement pendant 48h en appliquant le même protocole que décrit ci-dessus.

C. Test MTT

Le test de viabilité cellulaire sélectionné (MTT) mesure la respiration mitochondriale. Ce test est basé sur la réduction du sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives, en formazan. Ce phénomène est accompagné d'un changement de couleur du milieu, qui passe du

jaune au bleu violacé. L'intensité de la coloration est proportionnelle au nombre de cellules vivantes lors du test mais aussi à leur activité métabolique (Figure 6), (Fotakis et Timbrell, 2006). A la fin de l'exposition des cellules aux toxines, le milieu de culture est récupéré pour le test ELISA. Puis 100µl ou 200µL de milieu contenant 10% d'une solution de MTT 5mg/mL sont ajoutés dans chaque puits des plaques 96 ou 48 puits respectivement. Les plaques sont incubées 2 heures à 37°C. Le milieu contenant le MTT est ensuite éliminé par retournement de la plaque puis 100µl ou 200µL d'isopropanol acidifié sont ajoutés dans chaque puits pour dissoudre les cristaux de formazan. Une coloration violacée apparaît. Après 15 minutes d'agitation, l'absorbance est mesurée à la longueur d'onde de 570nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

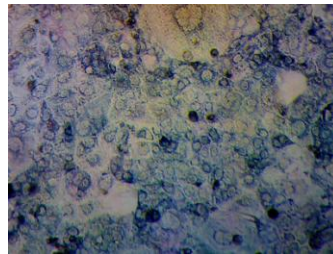


Figure 6 : Cellules Caco2 après coloration MTT ; grossissement : 100X

D. Analyse des données

Les données brutes sont traitées à l'aide du logiciel «OPTIMA ». La DO (Densité Optique) moyenne des blancs est soustraite à la DO des échantillons. Puis, les moyennes des DO, les SD (Déviation Standard) et les CV% (Coefficient de variation) sont calculés pour chaque réplica. Enfin, les résultats de viabilité sont exprimés en % par rapport au contrôle solvant, celui-ci étant estimé à 100%. Les données de DO ou de viabilité cellulaire sont analysées avec GraphPad Prism 5. Les concentrations des toxines sont converties en Log [toxine] afin de pouvoir effectuer une régression non-linéaire. La Concentration Inhibitrice 50% (CI50) est alors déterminée.

III. Test ELISA

A. Technique

Cette technique immuno-enzymatique permet de détecter ou doser des anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps considéré.

La veille de l'expérience, 100µL d'une solution d'anticorps (AC) primaire IL-8 (AC souris, Thermo) dilués au 1/1000^e dans du tampon carbonate (Annexe 3) sont ajoutés dans des plaques spéciales pour ELISA (Nunc immuno-plate). Les plaques sont incubées à 4°C pendant une nuit.

Après lavage des plaques ELISA au PBS/5% Tween20, 200µL de solution de saturation « superbloc blocking buffer » (Thermo # 37515) sont ajoutés.

Après une heure à température ambiante, une gamme d'interleukine recombinante de 7,9 à 1000pg/mL est réalisée dans du PSB additionné de 1% de BSA (Bovine Serum Albumin). Les milieux récupérés précédemment des tests de cytotoxicité sont dilués au quart. Les plaques ELISA sont vidées et 100µL des milieux dilués ainsi que la gamme d'IL8 sont déposés et incubés 1h30 sous agitation à température ambiante (TA). Elles sont ensuite lavées avec du PBS/5% Tween20. Après l'ajout de 100µL d'anticorps secondaires biotinylés (AC souris, Thermo) dilués au 1/1500^e dans du PBS/1% BSA, les plaques sont incubées 1 heure à TA sous agitation. Après lavage avec du PBS/5% Tween20, 100µL de solution de streptavidine peroxydase (S2438, 250UG ; Sigma) diluée au 1/1000^e dans du PBS/5% Tween20 sont ajoutés. Après une incubation de 45 minutes sous agitation à TA, les plaques sont lavées et colorées avec 100µL de « TMB-Elisa-Substrate » (Thermo # 34028). La réaction est ensuite stoppée avec 100µL d'acide sulfurique (figure 7). Les plaques sont lues au Fluostar à 405 nm.

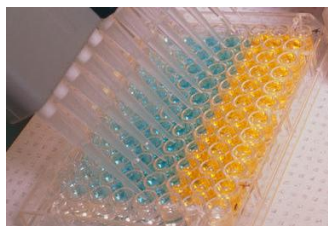


Figure 7 : Arrêt de la réaction de coloration par la TMB-Elisa substrate par ajout de H₂SO₄, pour le dosage d'IL-8

B. Analyse des données

Les données brutes sont traitées à l'aide du logiciel «OPTIMA ». La DO moyenne des blancs est soustraite aux DO des échantillons. Puis, les moyennes des DO, les SD et les CV% sont calculés pour chaque réplica. Les données de DO sont analysées avec GraphPad Prism 5. Une régression linéaire est réalisée avec les points de la gamme d'IL-8. La pente de la courbe est caractérisée. Les concentrations d'anticorps dans les échantillons peuvent ainsi être calculées.

IV. Immunomarquage

A. Principe

Les effets toxiques de la PnTx-G et des différentes fractions en fonction de leur concentration sur les cellules Caco-2 seront déterminés par immunomarquage, visualisés avec un microscope à fluorescence et quantifiés à l'aide d'un appareil de High Content Screening (HCS). Cet appareil automatise la quantification de la fluorescence de réactifs incorporés dans des cellules ou à leur surface. La fluorescence est localisée et quantifiée à l'aide d'un système optique couplé à des algorithmes. Deux marqueurs sont utilisés : H2AX-y et Ki67.

L'histone H2AX phosphorylée (H2AX-y) est essentielle pour la reconnaissance et la réparation des cassures double brin de l'ADN. En réponse à un stress sur l'ADN (radiations par exemple), de nombreuses molécules de H2AX sont rapidement phosphorylées par une protéine kinase au site de chaque cassure double brin dès qu'elle se produit (Burma et coll., 2001). Un anticorps dirigé contre l'histone H2AX-y permet de révéler ce processus.

L'antigène Ki67 fait partie des marqueurs de prolifération. Il est présent au niveau du noyau des cellules prolifératives, en phase G1, S, G2 et M et participerait au maintien du pouvoir prolifératif ou au contrôle du cycle cellulaire. Il est considéré comme étant un bon marqueur de l'index mitotique. Une augmentation du marquage corrèlerait également avec l'évolution néoplasique (Scholzen et Gerdes, 2000).

B. Ensemencement et traitement

L'ensemencement et le traitement des cellules s'effectuent comme décrit précédemment, en plaque Corning 96 puits, sur Caco-2 non différenciées.

C. Marquage

Après 24h de traitement, les cellules sont lavées avec du PBS puis fixées avec du paraformaldéhyde (PFA) 4% pendant 15 minutes à TA. Elles sont ensuite perméabilisées par du PBS+0,2% Triton 100X 10 minutes à TA, puis bloquées par du PBS+1% BSA+ 0,5% Tween20 1 heure à TA. Ensuite, 50µL de solution contenant l'AC primaire Ki67 (AC lapin, Interchim) au 1/1000^e et H2AX-y (AC souris, Thermo) au 1/1500^e, dans du PBS+1% BSA+ 0,5% Tween20 sont ajoutés. Les plaques sont incubées toute la nuit à 4°C.

Après lavage des plaques par du PBS/0,5 % Tween20, les AC secondaires (anti lapin et anti souris, Thermo) au 1/1000^e dans du PBS/1% BSA/ 0.5% Tween sont ajoutés. Après 45 minutes à TA dans le noir et 3 lavages au PBS/ 0,5 % Tween20, 50µL de DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) à 1µg/mL dans du PBS/0,5 % Tween20 sont ajoutés. Après 1,5 minutes, les plaques sont lavées avec du PBS et sont lues avec l'HCS. Trois canaux de fluorescence sont utilisés (386nm, 485nm, 549nm) pour les 3 différents marquages. Cinquante à 250 cellules sont mesurées par champ, 8 champs par puits (objectif 10X) avec une résolution de 0,68µm. Les données sont analysées automatiquement par différents algorithmes en fonction du canal de fluorescence utilisé. Une mesure de l'intensité de fluorescence dans chaque cellule est effectuée pour le marquage H2AX- y, alors qu'un pourcentage de cellules marquées sera calculé pour le marquage Ki67.

D. Analyse des données

Les données brutes sont extraites et traitées avec GraphPad Prism 5. Les données de fluorescence concernant Ki67 sont directement extraites de l'HSC en pourcentage par rapport au témoin solvant et analysées par le logiciel Graph Pad Prism5. Les données concernant H2AX-y sont converties en ratio par rapport au témoin solvant et sont ensuite analysées par le logiciel Graph Pad Prism5. Les concentrations des toxines sont converties en Log [toxine].

IV. Mesure de la TEER et dosage de la PnTx-G

A. Principe

La mesure de la TEER permet d'évaluer et de suivre l'intégrité de la monocouche de cellules mimant la barrière intestinale par insertion d'une électrode dans chaque puits. En effet les cellules Caco-2 différenciées forment une monocouche avec des cellules polarisées et présentant des jonctions serrées régulant le passage paracellulaire des molécules. Il existe donc une différence de potentiel entre le milieu basal et apical. Si l'intégrité de la monocouche est atteinte, cette différence de potentiel est altérée.

Une valeur élevée de la TEER indique que la monocouche est étanche et que de nombreuses jonctions serrées s'y sont formées. Certains toxiques peuvent

provoquer des lésions membranaires, perméabiliser la monocouche et provoquer une chute de la TEER.

B. Matériel

Les cellules Caco-2 différenciées seront utilisées dans cette expérience et ne seront traitées qu'avec 4 concentrations de PnTx-G, de l'extrait brut de *V. rugosum*, et de la fraction F3P3 qui contient la pinnatoxine.

C. Ensemencement des cellules (T0)

Les cellules Caco-2 sont ensemencées sur des inserts en plaque 24 puits (Costar, #3599) (Annexe 4) à la densité de 50 000 cellules/puits dans du milieu de culture MEM + SVF 10 %. Les cellules sont cultivées pendant 21 jours pour atteindre un bon état de différenciation. Au cours de ces 3 semaines, les milieux sont changés 3 fois par semaine.

D. Traitement des cellules

Les toxines (la PnTx-G, l'extrait brut et la fraction F3P3 de *V. rugosum*) sont diluées dans du milieu HBSS (HBSS (Hank's Buffered Salt Solution)/ 5mM HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique), pH 7,4) à partir des solutions stock (volume final de 300µl de solution en apical par insert pour traiter les cellules). La dose maximale en PnTx-G est de 32ng/mL, et en extrait de *Vulcanodinium* et de F3P3 de 5µg/mL afin de ne pas dépasser 5% de MeOH. Des dilutions successives en cascade au 1/2 sont effectuées pour obtenir 4 concentrations (concentrations finales de 32 ; 16 ; 8 ; 4ng/mL et de 5 ; 2,5 ; 1,25 ; 0,63µg/mL pour la PnTx-G et les extraits respectivement). Pour chaque plaque, 2 répliquas par condition, un témoin non traité (cellules en présence de HBSS), un blanc (puits sans cellules contenant de l'HBSS), un témoin solvant (cellules en présence de HBSS avec 5% de MeOH), un témoin positif (cellules en présence de HBSS additionné d'EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique) 10nM, pH 7,4), sont effectués. Après ajout de 1mL de HBSS dans chaque puits en basal, les plaques sont mises à incuber à 37° C.

E. Mesure de la TEER et récupération des échantillons pour le dosage

Avant traitement, l'intégrité de la couche cellulaire est vérifiée par mesure de la TEER à l'aide du Millicers-ERS (Millipore). Une mesure de la TEER est également effectuée après 2h et 24h de traitement. Les données sont ensuite converties en TEER relative par rapport au témoin HBSS.

Après 2 et 24h de traitement, les milieux d'incubation en apical et en basal sont récoltés et conservés à -20°C. Ils constitueront les échantillons pour effectuer les dosages afin d'estimer la quantité de PnTx-G ayant traversé la couche cellulaire.

F. Analyse par LC-MS

Une analyse par LC-MS/MS est effectuée sur les plus fortes concentrations testées (31 ng/mL pour la PnTx-G, 5 µg/mL pour l'extrait brut de *V. rugosum* et F3P3) dans le but de connaître la quantité de toxine dans les échantillons recueillis. Le matériel utilisé est un système HPLC couplé à un détecteur de masse. Le système HPLC se compose de deux pompes (LC-10ADvp), d'auto-injecteurs (SIL-10ADvp) avec support réfrigéré, d'un dégazeur (DGU-14A), d'un four à colonne (CTO-10ACvp) et d'un contrôleur de système (SCL-10Avp). Ce système a été couplé à un QTRAP LC / MS / MS qui consiste en un hybride de spectromètre de masse piège à ions. La colonne utilisée est une colonne analytique 2 mm × 50 mm BDS-Hypersil-C8. La température a été fixée à 25 °C. La phase mobile est constituée de deux composantes : eau (A) et acétonitrile/eau (95:5) (B), contenant 50mM d'acide formique et 2mM de formiate d'ammonium. La séparation chromatographique a été effectuée par élution par gradient en commençant par B 30-90% pendant 8 minutes, puis, B 90-10% maintenu pendant 3 min puis en réduisant ensuite B à 30% pendant 3min. Le taux d'écoulement de la phase mobile est de 0,2mL/min-1 et le volume d'injection est de 4µL. Une courbe de calibration de pinnatoxine G (de 10 à 1000 nM) est effectuée afin de déterminer la concentration présente dans chaque échantillon.

Résultats

I. Tests de cytotoxicité

Les effets de la PnTx-G, de l'extrait brut de *Vulcanodinium rugosum* et des 13 sous-fractions ont été évalués sur la viabilité des cellules Neuro2A et Caco-2 différenciées ou non. Pour chaque expérience, le solvant (MeOH 5%) ne provoque pas de cytotoxicité comparé au témoin cellules alors que le témoin positif (acide okadaïque, 1nM) entraîne une forte baisse de la viabilité (autour de 50%).

Les courbes de viabilité cellulaire ont été tracées afin de déterminer les CI50. Une comparaison des traitements 24h et 48h sur Caco-2 non différenciées ainsi qu'une comparaison Caco-2 et Neuro2A 24h est effectuée. Les résultats des deux expériences sur Caco-2 différenciées sont également présentés.

La pinnatoxine G

La PnTx-G jusqu'à 32ng/ml n'altère pas la viabilité des cellules Caco-2 non différenciées que ce soit à 24h ou 48h de traitement (figure 8a.). Aucun effet cytotoxique n'est également observé sur les cellules Neuro2A après 24h d'exposition (figure 8b.). De même, les 2 expériences sur Caco-2 différenciées n'ont pas montré d'effet cytotoxique de la PnTxG jusqu'à 32ng/ml (figure 9). Ainsi, sur les différents types cellulaires et pour les différents temps de traitement, aucune CI50 n'a pu être déterminée.

Extrait brut de *Vulcanodinium rugosum*

A la concentration maximale de 5µg/mL, l'extrait brut de *V. rugosum* a entraîné une diminution de la viabilité des Caco-2 non différenciées de 30% après 24h de traitement et de 40% après 48h de traitement (figure 10 a.). La cytotoxicité de l'extrait brut est plus importante sur Neuro2A que sur Caco-2 avec une baisse de la viabilité suivant un effet dose et atteignant 74% à 5µg/mL (figure 10 b.). Une CI50 de 0,326µg/mL peut être établie pour cette lignée (tableau I). Par contre, il n'y a pas de diminution de viabilité sur les Caco-2 différenciées. Au contraire, aux plus fortes concentrations (2,5 et 5µg/mL) il y a une augmentation du signal de plus de 200% (figure 11).

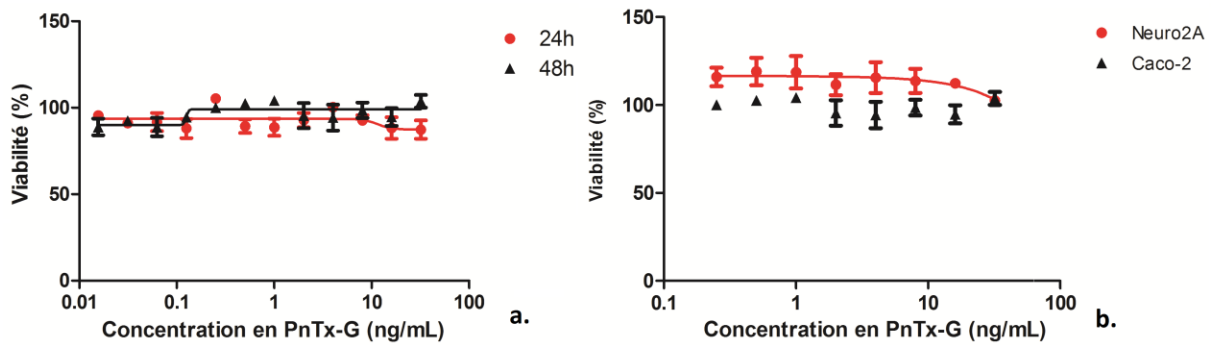


Figure 8 : Comparaison des effets cytotoxiques de la PnTx-G pure (a.) sur Caco-2 non différenciées après 24h et 48h de traitement (b.) sur Caco-2 non différenciées et sur Neuro 2A après 24h de traitement.

La viabilité cellulaire est estimée en pourcentage, 100% de viabilité correspondant au témoin solvant (MeOH 5%). Les résultats sont obtenus à partir de deux expériences indépendantes. Les valeurs présentées sont les moyennes des résultats obtenus avec leurs écarts types.

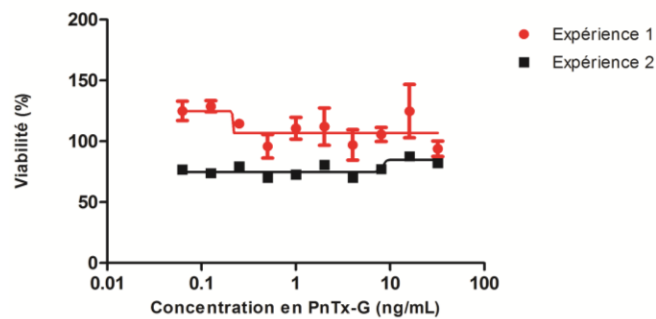


Figure 9 : Effets cytotoxiques de la PnTx-G pure sur Caco-2 différenciées après 48h de traitement.

La viabilité cellulaire est estimée en pourcentage, 100% de viabilité correspondant au témoin solvant (MeOH 5%). Les résultats sont obtenus à partir de deux expériences indépendantes. Les valeurs présentées sont les moyennes des résultats obtenus avec leurs écarts types.

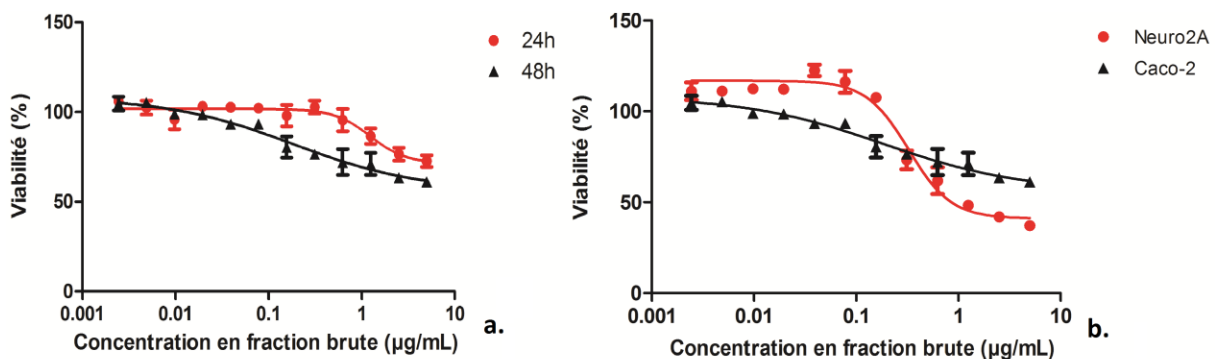


Figure 10: Comparaison des effets cytotoxiques de l'extrait brut de *Vulcanodinium rugosum* (a.) sur Caco-2 non différenciées après 24h et 48h de traitement (b.) sur Caco-2 non différenciées et sur Neuro2A après 24h de traitement.

La viabilité cellulaire est estimée en pourcentage, 100% de viabilité correspondant au témoin solvant (MeOH 5%). Les résultats sont obtenus à partir de deux expériences indépendantes. Les valeurs présentées sont les moyennes des résultats obtenus avec leurs écarts types.

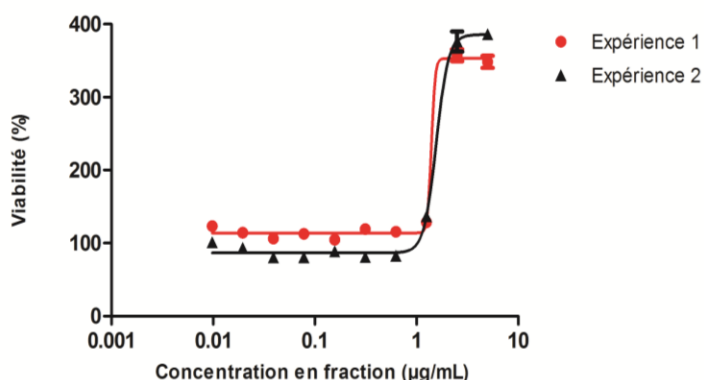


Figure 11 : Courbes de viabilité des cellules Caco-2 différenciées après 48h de traitement à l'extrait brut de *Vulcanodinium rugosum*..

La viabilité cellulaire est estimée en pourcentage, 100% de viabilité correspondant au témoin solvant (MeOH 5%). Les résultats sont obtenus à partir de deux expériences indépendantes. Les valeurs présentées sont les moyennes des résultats obtenus avec leurs écarts types.

Purifications 1 et 2

A la concentration maximale de 5µg/mL, les fractions F1P1 et F1P2 entraînent une diminution de la viabilité des Caco-2 non différenciées de 40% et 45% après 24h et 48h de traitement (figure 12 a. et 12 b.). La cytotoxicité des fractions est plus importante sur Neuro2A que sur Caco-2 avec une baisse de la viabilité suivant un effet dose et atteignant 90% pour F1P1 (figure 12 c.) et 85% pour F1P2 (figure 12 d.) à la plus forte concentration, 5µg/mL. Des CI50 peuvent être établies sur la lignée Neuro2A (tableau I) : 0,145µg/mL pour F1P1 et 0,025µg/mL pour F1P2. Il n'y a pas de cytotoxicité observée sur les cellules Caco-2 différenciées aux plus faibles concentrations (de 0,005 à 0,08µg/mL) avec une viabilité des cellules maintenue à 100%. Aux concentrations plus élevées (entre 0,65 et 5µg/mL pour F1P1 et entre 0,16 et 5µg/mL pour F1P2), une augmentation du signal pouvant aller jusqu'à 250% est observée (figure 13).

Purification 3

A la plus forte concentration (5µg/mL), on observe une baisse de la viabilité des Caco-2 non différenciées de 20 à 30% à 24h et de 25% à 45% à 48h selon la fraction testée (figure 14).

La cytotoxicité sur Neuro2A est plus importante que sur Caco2 non différenciées avec une diminution de 45% à 5µg/mL pour la fraction F1P3, de 100% dès 0,16µg/mL pour F2P3, dès 0,6µg/mL pour F3P3, et à 5µg/mL pour F4P3, et de 90% pour la fraction F5P3 à 5µg/mL (figure 15). Les CI50 établies sur la lignée Neuro2A sont (tableau I) : 0,011µg/mL pour F2P3 ; 0,025µg/mL pour F3P3 ; 0,575µg/mL pour

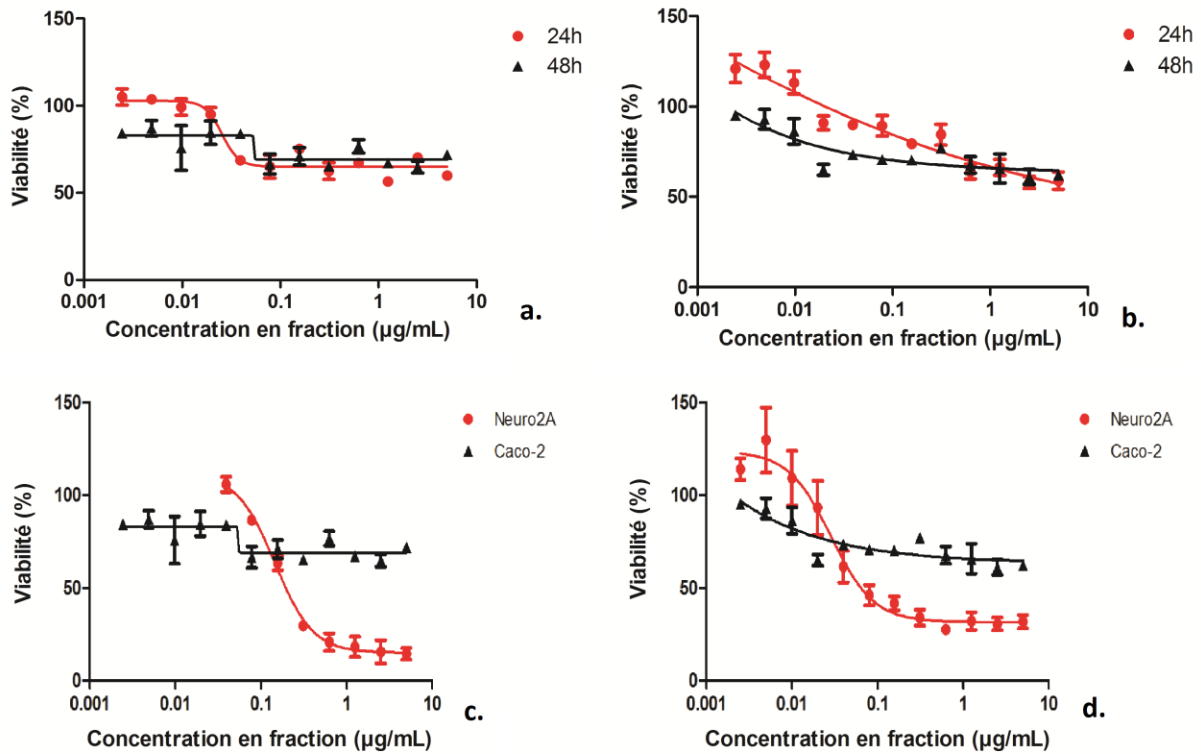


Figure 12: Comparaison des effets cytotoxiques de (a.) F1P1 et de (b.) F1P2 sur Caco-2 non différenciées après 24h et 48h de traitement et de (c.) F1P1 et (d.) F1P2 sur Caco-2 non différenciées et Neuro2A après 24h de traitement.

La viabilité cellulaire est estimée en pourcentage, 100% de viabilité correspondant au témoin solvant (MeOH 5%). Les résultats sont obtenus à partir de deux expériences indépendantes. Les valeurs présentées sont les moyennes des résultats obtenus avec leurs écarts types.

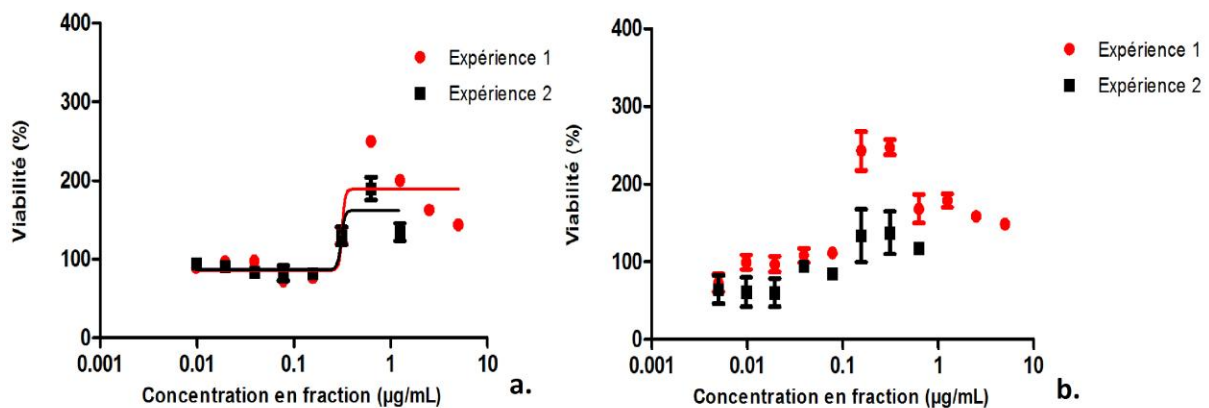


Figure 13: Effets cytotoxiques de fractions (a.) F1P1 et (b.) F1P2 de *Vulcanodinium rugosum* sur Caco-2 différenciées après 48h de traitement.

La viabilité cellulaire est estimée en pourcentage, 100% de viabilité correspondant au témoin solvant (MeOH 5%). Les résultats sont obtenus à partir de deux expériences indépendantes. Les valeurs présentées sont les moyennes des résultats obtenus avec leurs écarts types.

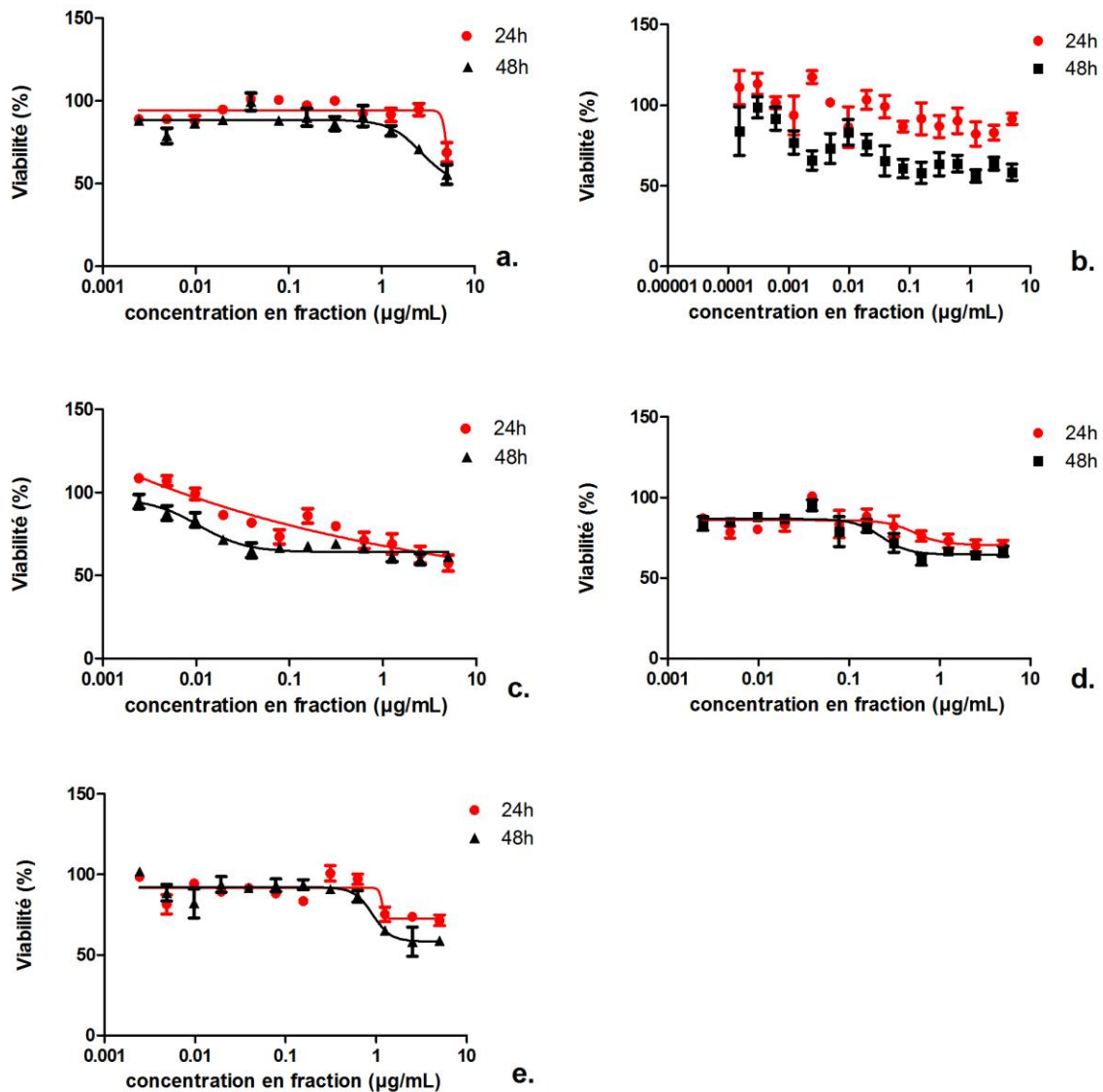


Figure 14 : Comparaison des effets cytotoxiques de s fractions (a.) F1P3, (b.) F2P3, (c.) F3P3, (d.) F4P3 et (e.) F5P3 de *Vulcanodinium rugosum* sur Caco-2 non différenciées après 24h et 48h de traitement.

La viabilité cellulaire est estimée en pourcentage, 100% de viabilité correspondant au témoin solvant (MeOH 5%). Les résultats sont obtenus à partir de deux expériences indépendantes au minimum. Les valeurs présentées sont les moyennes des résultats obtenus avec leurs écarts types.

F4P3 et 1,140µg/mL pour F5P3. Un ordre de cytotoxicité peut être établi soit : F2P3>F3P3>F4P3>F5P3>F1P3.

Il n'y a pas de cytotoxicité observée sur les cellules Caco-2 différenciées pour F1P3 jusqu'à 5µg/mL. Les courbes des autres fractions montrent une augmentation du signal d'environ 200% à 300%. Cependant cette augmentation apparaît pour des faibles doses, 0,08µg/mL et 0,16µg/mL respectivement, pour F2P3 et pour F3P3, alors que pour F4P3 et F5P3, elle n'apparaît qu'aux dernières concentrations testées 2,5µg/mL et 5µg/mL (figure 16).

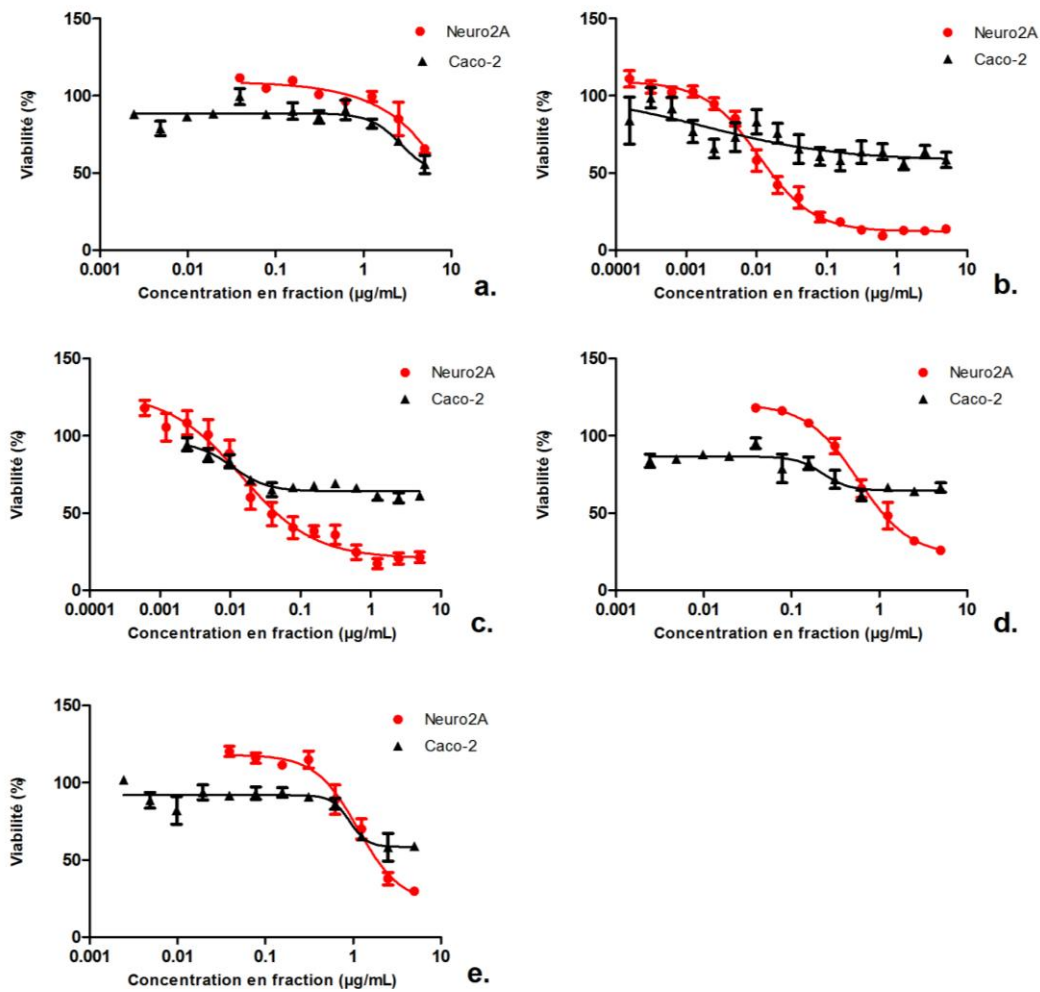


Figure 15 : Comparaison des effets cytotoxiques des fractions (a.) F1P3, (b.) F2P3, (c.) F3P3, (d.) F4P3 et (e.) F5P3 de *V. rugosum* sur Caco-2 non différenciées et Neuro2A après 24h de traitement.

La viabilité cellulaire est estimée en pourcentage, 100% de viabilité correspondant au témoin solvant (MeOH 5%). Les résultats sont obtenus à partir de deux expériences indépendantes au minimum. Les valeurs présentées sont les moyennes des résultats obtenus avec leurs écarts types.

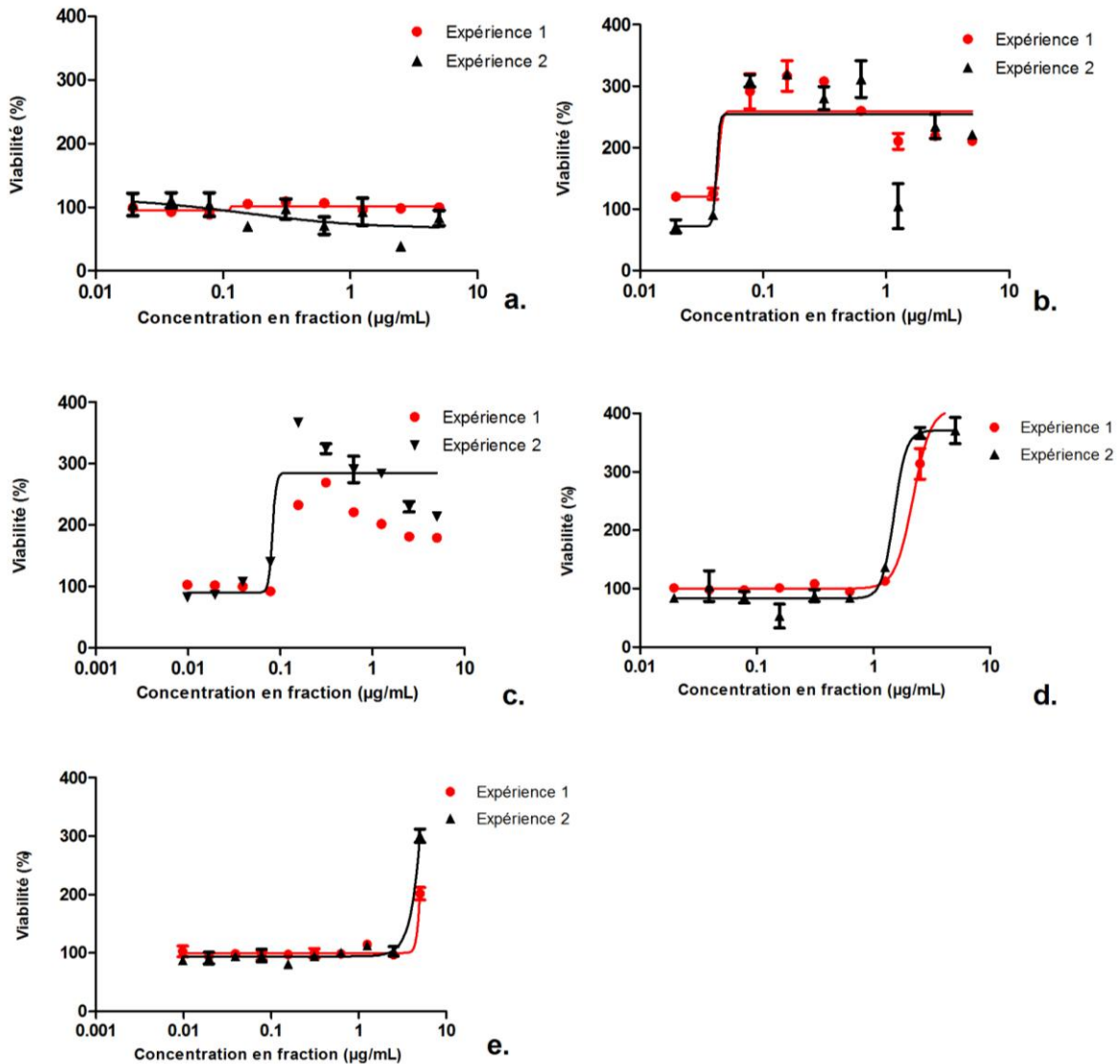


Figure 16 : Effets cytotoxiques des fractions (a.) F1P3, (b.) F2P3, (c.) F3P3, (d.) F4P3 et (e.) F5P3 de *Vulcanodinium rugosum* sur Caco-2 différenciées après 48h de traitement.

La viabilité cellulaire est estimée en pourcentage, 100% de viabilité correspondant au témoin solvant (MeOH 5%). Les résultats sont obtenus à partir de deux expériences indépendantes au minimum. Les valeurs présentées sont les moyennes des résultats obtenus avec leurs écarts types.

Purification 4

Sur les cellules Caco2 non différenciées, pour la plus forte concentration (5µg/mL), une baisse de la viabilité de 20% à 30 % est observée à 24h et de 30% à 40% à 48h selon les fractions F1P4 à F6P4 (figure 17).

La cytotoxicité sur les cellules Neuro2A est plus importante que sur les Caco-2 non différenciées. En effet, la baisse de viabilité atteint (essentiellement pour la plus forte concentration 5µg/mL) 90 à 95% pour les fractions F1P4, F2P4 et F5P4 et

seulement 70% pour F6P4. Par contre, les fractions F3P4 et F4P4 montre un effet dose pour des concentrations beaucoup plus faibles puisque la F3P4 provoque une diminution de la viabilité de 70% dès 0,3 µg/mL et de 90% pour F4P4 dès 0,08µg/mL (figure 18). Les CI50 établies sur la lignée Neuro2A sont présentées dans le tableau I. Le classement des fractions selon ce paramètre est le suivant : F4P4>F3P4>F1P4>F2P4>F5P4>F6P4.

Les courbes de cytotoxicité sur les cellules Caco-2 différenciées ne montrent aucune cytotoxicité aux plus faibles concentrations sur l'ensemble des fractions testées. Par contre, une augmentation du signal de 350% à 400% est observée à 5µg/mL pour F1P4, F2P4 et F5P4. Pour les fractions F3P4 et F4P4, une augmentation atteignant 200 à 250% est observée dès 0,31µg/mL et 0,16µg/mL respectivement. Il n'y a pas de cytotoxicité observée sur les cellules Caco-2 différenciées pour la fraction F6P4 et aucune augmentation du signal quelle que soit la concentration testée (figure 19).

Echantillon	CI50 Neuro2A
PnTx-G	Non déterminée
<i>V. rugosum</i> brut	0,326 ± 0,190
F1P1	0,145 ± 0,008
F1P2	0,025 ± 0,016
F1P3	Non déterminée
F2P3	0,011 ± 0,006
F3P3	0,025 ± 0,019
F4P3	0,575 ± 0,185
F5P3	1,14 ± 0,340
F1P4	0,474 ± 0,237
F2P4	0,595 ± 0,046
F3P4	0,073 ± 0,009
F4P4	0,012 ± 0,008
F5P4	0,603 ± 0,013
F6P4	1,914 ± 0,901

Tableau I : Tableau des CI50 des différents échantillons testés sur la lignée cellulaire Neuro2A pendant 24h. Les valeurs des CI50 sont représentées avec leur écart type. Certaines CI50 n'ont pu être déterminées. Les résultats sont obtenus à partir de deux manipulations indépendantes au minimum. Les valeurs présentées ont été déterminées à l'aide du logiciel « Graphpad Prism5 » à partir des courbes de viabilité des cellules Neuro2A.

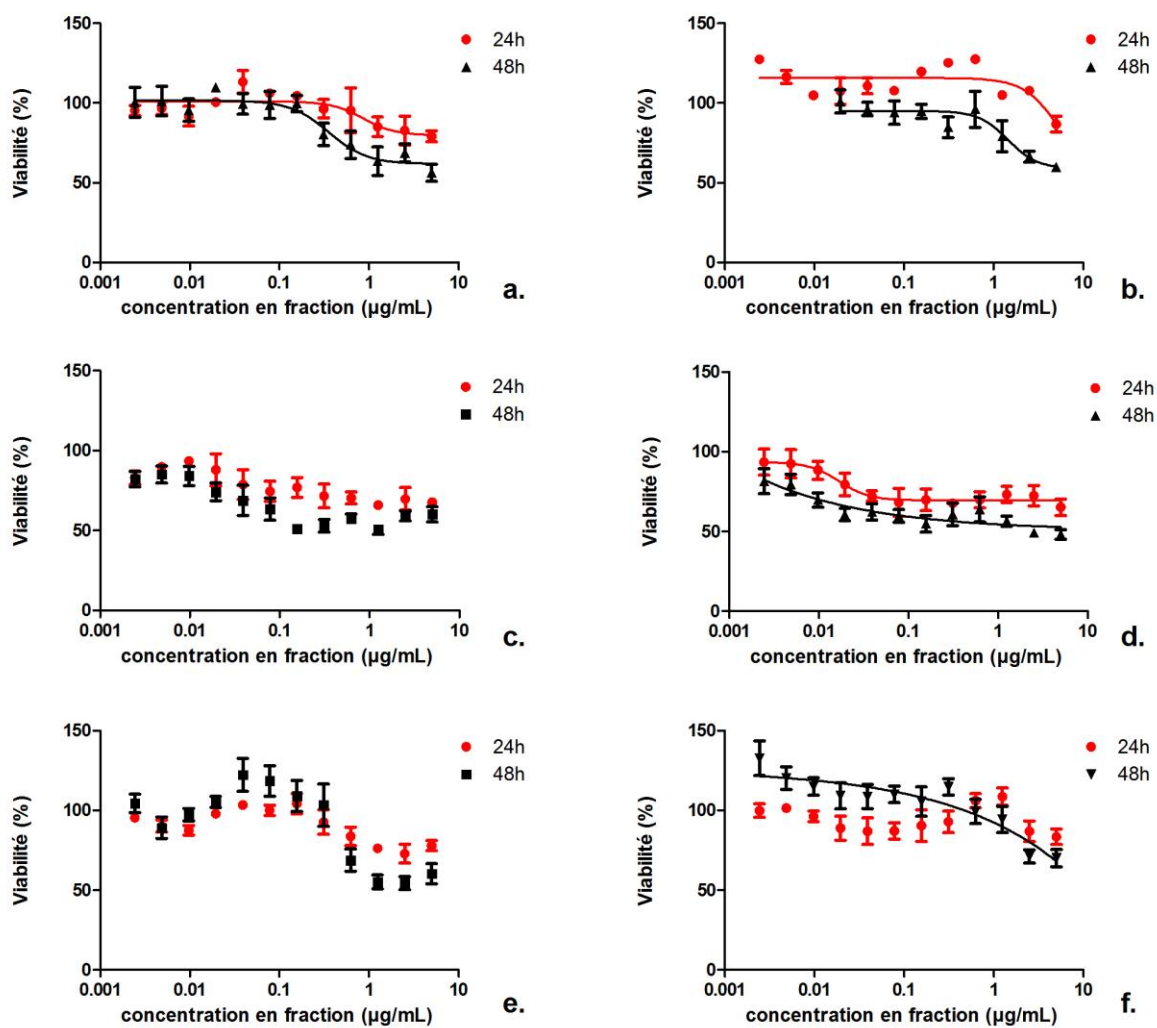


Figure 17: Comparaison des effets cytotoxiques des fractions (a.) F1P4, (b.) F2P4, (c.) F3P4, (d.) F4P4, (e.) F5P4 et (f.) F6P4 de *Vulcanodinium rugosum* sur Caco-2 non différenciées après 24h et 48h de traitement.

La viabilité cellulaire est estimée en pourcentage, 100% de viabilité correspondant au témoin solvant (MeOH 5%). Les résultats sont obtenus à partir de deux expériences indépendantes au minimum. Les valeurs présentées sont les moyennes des résultats obtenus avec leurs écarts types.

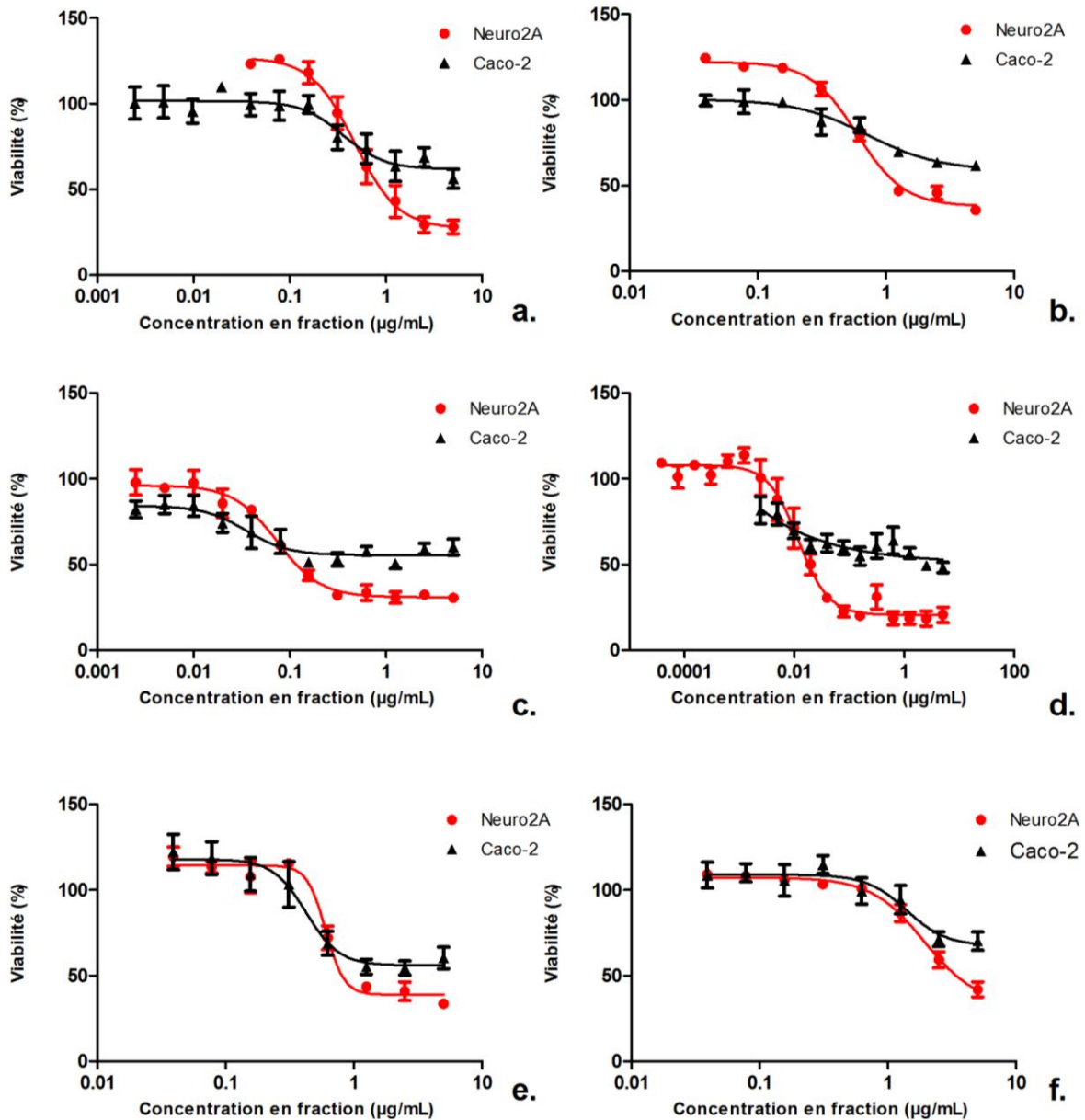


Figure 18 : Comparaison des effets cytotoxiques des fractions (a.) F1P4, (b.) F2P4, (c.) F3P4, (d.) F4P4, (e.) F5P4 et (f.) F6P4 de *V. rugosum* sur Caco-2 non différenciées et Neuro2A après 24h de traitement.

La viabilité cellulaire est estimée en pourcentage, 100% de viabilité correspondant au témoin solvant (MeOH 5%). Les résultats sont obtenus à partir de deux expériences indépendantes au minimum. Les valeurs présentées sont les moyennes des résultats obtenus avec leurs écarts types.

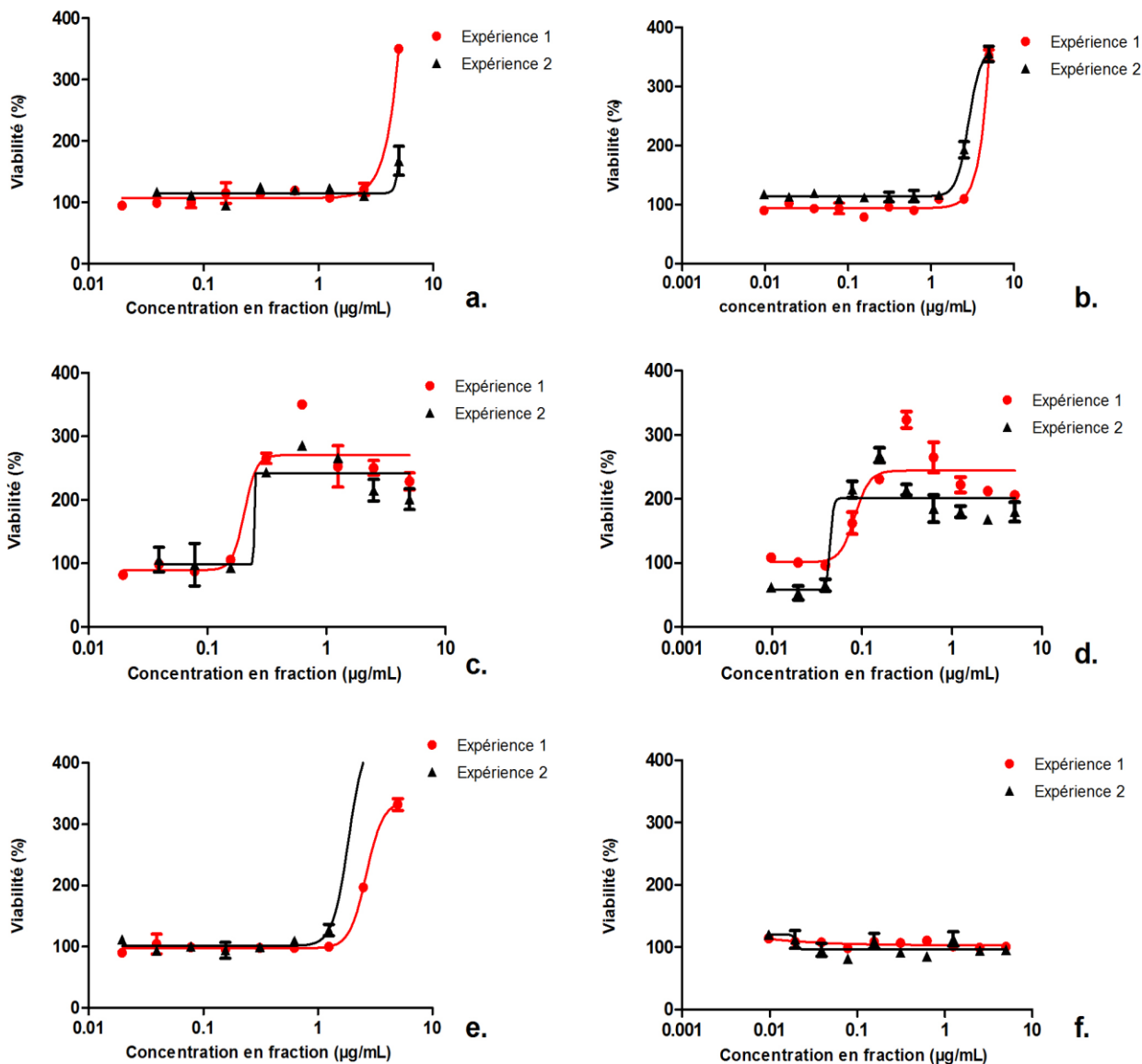


Figure 19 : Effets cytotoxiques de s fractions (a.) F1P4, (b.) F2P4, (c.) F3P4, (d.) F4P4, (e.) F5P4 et (f.) F6P4 de *Vulcanodinium rugosum* sur Caco-2 différenciées après 48h de traitement.

La viabilité cellulaire est estimée en pourcentage, 100% de viabilité correspondant au témoin solvant (MeOH 5%). Les résultats sont obtenus à partir de deux expériences indépendantes au minimum. Les valeurs présentées sont les moyennes des résultats obtenus avec leurs écarts types.

II. Mesure de l'inflammation

La PnTx-G, l'extrait brut et les différentes fractions purifiées, à l'exception de la F5P3, ne provoquent pas d'augmentation significative de la sécrétion d'IL-8 par les Caco-2 non différenciées, les sécrétions d'IL-8 restant similaires à celle du témoin solvant (soit environ 250pg/mL), quelle que soit la concentration testée. Par contre, la

fraction F5P3 induit une sécrétion d'IL-8 avec un pic de production de 825pg/mL à 0,3µg/mL (figure 20 a.).

Pour la PnTx-G et pour chaque fraction, quelle que soit la concentration testée, les sécrétions d'IL-8 sont similaires au témoin solvant (soit environ 300pg/mL) sur les Caco-2 différenciées (figure 20 b.). Même la fraction F5P3 n'induit pas d'augmentation de la sécrétion comme obtenu précédemment sur les Caco2 non différenciées.

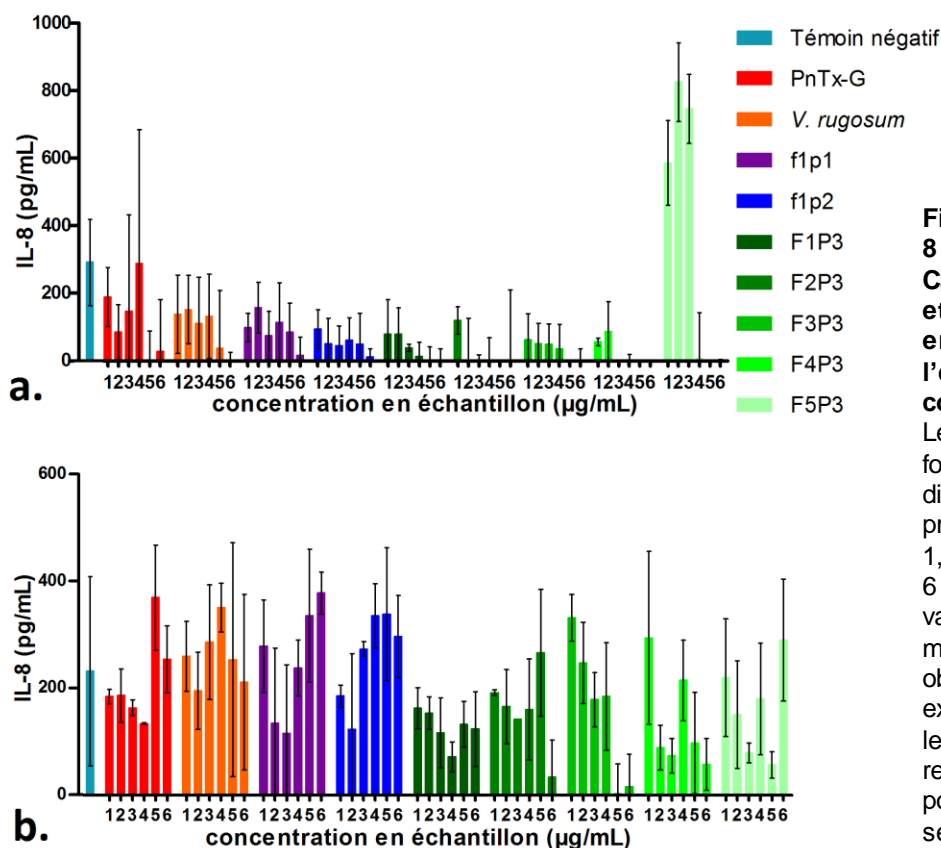


Figure 20 : Sécrétion d'IL-8 par les cellules (a.) Caco-2 non différenciées et (b.) Caco-2 différenciées en fonction de l'échantillon et de la concentration testés.

Les résultats des 6 plus fortes concentrations des différents échantillons sont présentés (0,15 ; 0,3 ; 0,6 ; 1,25 ; 2,5 et 5µg/mL de 1 à 6 respectivement). Les valeurs présentées sont les moyennes des résultats obtenus lors de deux expériences indépendantes, les écarts types sont représentés. Le témoin positif (OA) entraîne une sécrétion d'IL-8 d'environ 620pg/mL.

III. High Content Screening

Les effets sur la prolifération (Ki67) et sur l'altération de l'ADN (H2AX-y) de la PnTx-G, de l'extrait brut de *V. rugosum*, de F1P2, et des 5 fractions issues de la 3^e purification ont été évalués sur les cellules Caco-2 non différenciées, visualisés par marquage immunofluorescent (figure 21) et quantifiés à l'aide d'un appareil de High Content Screening (HCS). Les résultats obtenus ont permis de tracer des courbes dose/ réponse pour chaque marqueur Ki67 et H2AX-y.

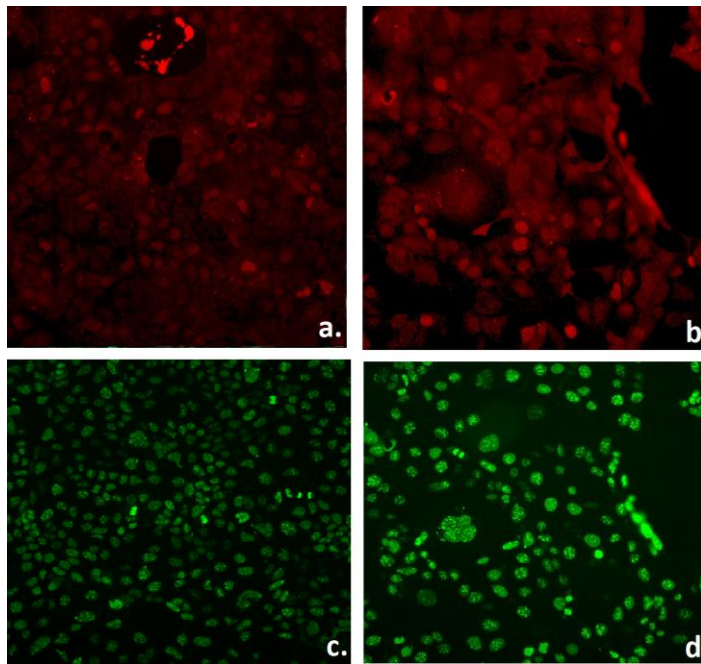


Figure 21: marquage des cellules Caco-2 non différenciées par H2AX- γ (a. et b.) et par Ki67 (c. et d.). a. et c. représentent les témoins solvant, et b. et d. les cellules traitées par F3P3 5 $\mu\text{g/mL}$

Mesure de l'altération de l'ADN

La PnTx-G n'entraîne aucune variation de l'intensité de H2AX- γ par rapport au témoin solvant aux concentrations testées (jusqu'à 32 ng/ml) indiquant que cette toxine ne produit pas d'altérations de l'ADN détectées par ce test. L'extrait brut de *V. rugosum* provoque une augmentation des altérations de l'ADN de manière dose dépendante avec une intensité de H2AX- γ 2 à 3 fois supérieure au témoin solvant pour des concentrations de 0,63 $\mu\text{g/mL}$ à 5 $\mu\text{g/mL}$.

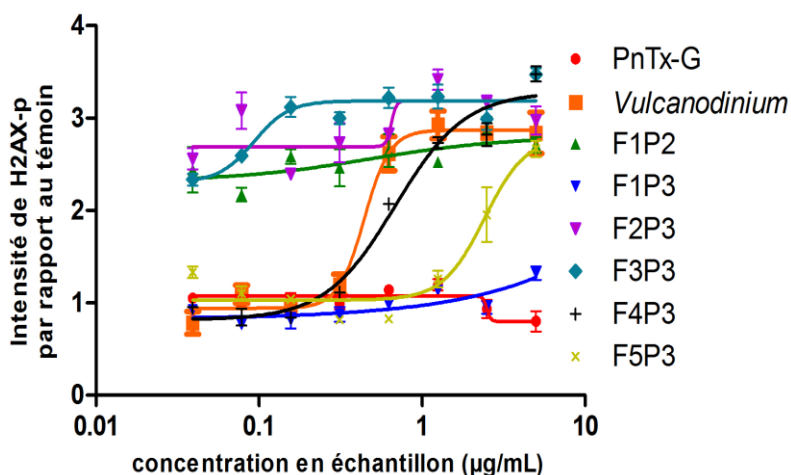


Figure 22: Comparaison des effets génotoxiques de la PnTx-G pure, de l'extrait brut de *V. rugosum* et de 6 fractions de *V. rugosum* sur Caco-2 non différenciées après 24h de traitement.

L'intensité de H2AX est estimée en ratio, par rapport au témoin solvant (MeOH 5%) dont la valeur est fixée à 1. Les résultats sont obtenus à partir de deux expériences indépendantes. Les valeurs présentées sont les moyennes des résultats obtenus avec leurs écarts types.

La 2^e purification F1P2 induit également une augmentation de ce paramètre du même ordre de grandeur mais sans effet dose, dès la plus faible concentration testée (0.025 $\mu\text{g/mL}$). Pour les fractions de la 3^e purification, la première fraction F1P3 ne produit pas d'altération de l'ADN quelle que soit la concentration testée jusqu'à

5µg/ml. Les 2 fractions suivantes F2P3 et F3P3 augmentent de 2 à 3 fois l'intensité de H2AX-γ par rapport au témoin, pour toutes les concentrations testées. Les 2 dernières fractions F4P3 et F5P3 induisent une augmentation dose dépendante. Cette augmentation est provoquée pour des concentrations supérieures à 0,31µg/mL pour la F4P3 et à 1,25µg/mL pour la F5P3 (figure 22).

Mesure de la prolifération

La PnTx-G n'entraîne aucune variation de l'intensité de la réponse Ki67 par rapport au témoin solvant aux concentrations testées (jusqu'à 32ng/mL) indiquant que cette toxine n'a pas d'effet sur la prolifération détecté par ce test. L'extrait brut de *V. rugosum* provoque une augmentation de la réponse Ki67 de manière dose dépendante atteignant une réponse jusqu'à 5 fois supérieure au témoin solvant dès 0,63µg/mL. La F1P2 induit également une augmentation de ce paramètre du même ordre de grandeur. Pour les fractions de la 3^e purification, les fractions F1P3, F4P3 et F5P3 induisent une augmentation dose dépendante atteignant 50% de réponse dès 0,31µg/mL pour la F1P3 et la F5P3 et dès 0,16µg/mL pour la F4P3. Les fractions F2P3 et F3P3 entraînent une augmentation de la réponse Ki67 avec 60% et 45% des cellules qui sont marquées respectivement, et ce, quelle que soit la concentration testée (figure 23).

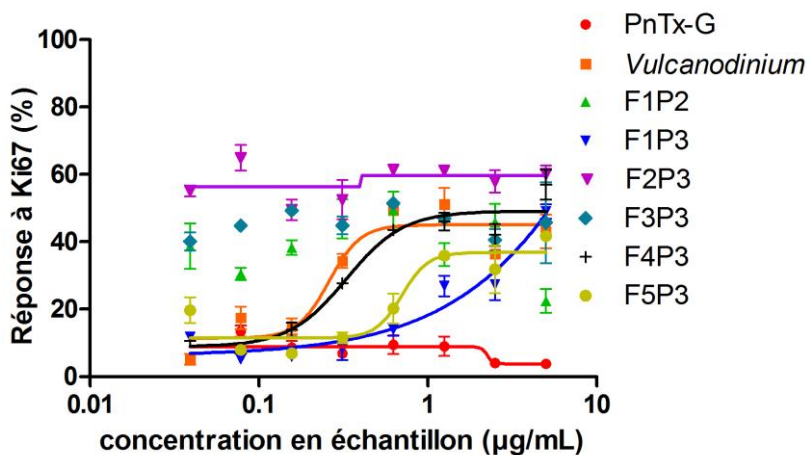


Figure 23: Comparaison des effets sur la prolifération de la PnTx-G pure, de l'extrait brut de *V. rugosum* et des 6 fractions de *V. rugosum*, sur Caco-2 non différenciées après 24h de traitement.

La réponse à Ki67 est estimée en pourcentage, par rapport au témoin solvant (MeOH 5%) dont la valeur est fixée à 0%. Les résultats sont obtenus à partir de deux expériences indépendantes. Les valeurs présentées sont les moyennes des résultats obtenus avec leurs écarts types.

IV. Mesure de la TEER

Le solvant (MeOH 5%) ne provoque pas d'altération de l'intégrité de la monocouche après 2h et 24h de traitement (TEER relative avoisinant 1). La PnTx-G jusqu'à 32ng/ml n'a pas d'effet sur la TEER après 2h et 24h de traitement (figure 24).

Par contre le témoin positif (EDTA 10nM) provoque une altération importante de la TEER après 2h (0,4X le témoin HBSS) et encore plus marquée après 24h où elle atteint presque 0 (figure 24, 25 ,26).

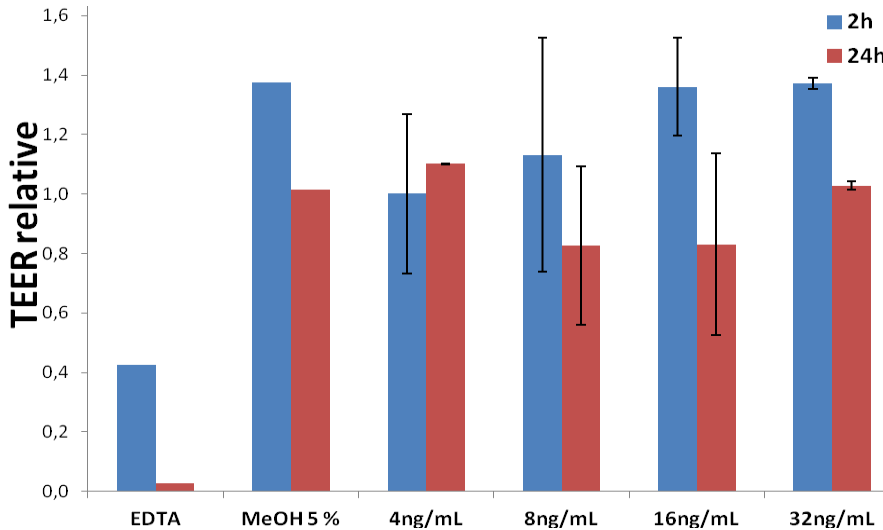


Figure 24 : TEER relative d'une monocouche de cellules Caco-2 après ajout de PnTx-G.

La TEER relative est estimée en ratio par rapport au témoin HBSS dont la valeur est fixée à 1. L'expérience a été réalisée en duplicata. Les valeurs présentées sont les moyennes des résultats obtenus avec leurs écarts types.

Le niveau de la TEER de la monocouche traitée par l'extrait brut reste élevé après 2h d'exposition, ne montrant pas d'altération de l'intégrité de la monocouche, mais diminue fortement (0.2 à 0.1) à 24h aux 3 plus fortes concentrations (1,25 ; 2,5 et 5µg/mL). Une diminution moindre de la TEER est observée à 0,6µg/mL après 24h de traitement (0,65X le témoin HBSS) (figure 25).

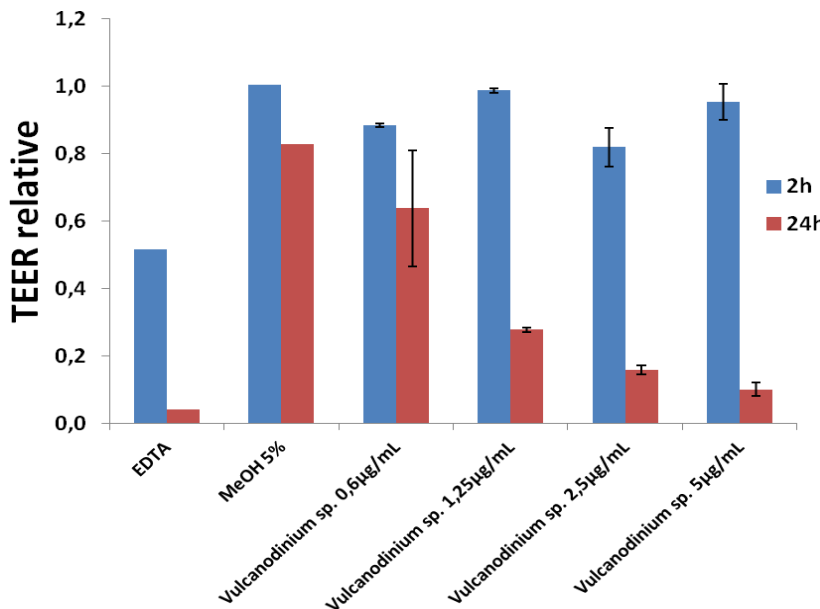


Figure 25 : TEER relative d'une monocouche de cellules Caco-2 après ajout de fraction brut de *Vulcanodinium sp.*

La TEER relative est estimée en ratio par rapport au témoin HBSS dont la valeur est fixée à 1. L'expérience a été réalisée en duplicata. Les valeurs présentées sont les moyennes des résultats obtenus avec leurs écarts types.

La TEER relative de la monocouche traitée par la fraction F3P3 reste élevée après 2h de traitement (entre 0,75 et 0,9) mais diminue fortement (0,1) après 24h de traitement, pour toutes les concentrations testées (figure 26).

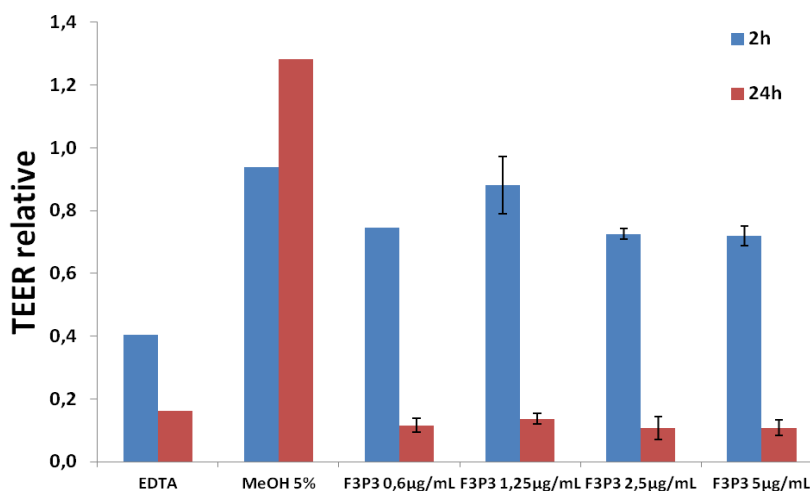


Figure 26 : TEER relative d'une monocouche de cellules Caco-2 après ajout de fraction F3P3 de *Vulcanodinium sp.*

La TEER relative est estimée en ratio par rapport au témoin HBSS dont la valeur est fixée à 1. L'expérience a été réalisée en duplicata. Les valeurs présentées sont les moyennes des résultats obtenus avec leurs écarts types.

V. Passage de la PnTx-G au travers de la barrière intestinale *in vitro*

Les chromatogrammes (annexe 5) mettent en évidence la présence ou non de PnTx-G dans l'échantillon testé. Seule la plus forte concentration de la toxine et des deux fractions testées a été analysée. La PnTxG présente dans les différents échantillons est quantifiée à l'aide d'une droite de calibration de la PnTx-G (annexe 6). La quantité de PnTx-G ayant traversée la monocouche de cellules Caco-2 reste faible après 2h de traitement (seulement 8,8% de la quantité déposée) mais atteint 65 % après 24h (Tableau II). La fraction F3P3 contient bien de la PnTx-G puisqu'elle est retrouvée en apical et en basal après 2h d'exposition. Les quantités ont été calculées à partir la concentration en PnTxG détectée dans cette fraction par l'ifremer soit 202ng/mg d'extrait (P. Hess, communication personnelle). Une quantité plus importante qu'avec la PnTxG pure est retrouvée en basal après 2h de traitement (Tableau II) : 23 % au lieu de 8% alors que la quantité initialement déposée est similaire. Dans l'extrait brut, une faible concentration de PnTx-G est retrouvée en apical ainsi qu'en basal après 2 h d'exposition (0,91 nM dans les 2 cas). Cependant aucun calcul sur la quantité ayant traversée par rapport à la quantité déposée ne peut être effectué car la concentration de PnTxG dans l'extrait brut n'a pas été mesurée. Les résultats après 24h d'exposition à l'extrait brut et à la fraction F3P3 n'ont pas pu être analysés car une forte altération de l'intégrité des monocouches de cellules a été montrée dans ces conditions par les mesures de TEER (figure 25 et 26).

Traitement		PnTx-G (nM)	% par rapport à quantité déposée
PnTx-G (13,9 nM) soit 32ng/mL	2h apical	10,97	79,04
	2h basal	1,22 ±0,42	8,78 ±3,06
	24h apical	5,50 ±0,44	39,66 ±3,18
	24h basal	9,05 ±0,41	65,19 ±2,9
F3P3 (13nM de PnTx-G)	2h apical	7,31 ±2,76	55,80 ±21,09
	2h basal	3,11 ±0,58	23,75 ±4,43
extrait brut	2h apical	0,91 ±0,11	-
	2h basal	0,91 ±0,31	-

Tableau II : Dosage des PnTx-G ayant traversées la monocouche cellulaire après un traitement 2h ou 24 par la PnTx-G, 2h par F3P3 ou 2h par l'extrait brut de *Vulcanodinium* sp.

Les résultats sont issus d'une expérience réalisée en duplicata. Les valeurs présentées sont les moyennes des résultats obtenus avec leurs écarts types.

Discussion

Ces dernières années, les efflorescences phytoplanctoniques ont augmenté en fréquence et en intensité, affectant également de nouvelles zones littorales et mettant en évidence de nouvelles espèces productrices de toxines, donc de nouvelles toxines.

Récemment l'espèce *Vulcanodinium rugosum*, a été identifiée comme productrice de PnTx. Sa toxicité suspectée n'a encore été que peu étudiée. Ce travail vise à apporter des connaissances permettant de mieux identifier le danger pour l'homme suite à la consommation de coquillages contenant cette micro algue ou cette famille de toxine. Pour cela, les réponses obtenues sur deux modèles cellulaires utilisés précédemment pour le programme Arcachon ont été qualifiées suite à l'exposition à la PnTx-G ou à des extraits provenant d'une culture de ce dinoflagellé : le modèle Caco-2, représentatif des cellules absorbantes intestinales, et les cellules Neuro2A, modèle neuronal (Kogure et coll., 1988 ; Costa 1998).

Nos résultats montrent que la PnTx-G pure ne provoque pas de toxicité jusqu'à 32ng/mL sur les cellules Neuro2A ni sur les cellules Caco-2 différenciées ou non après 24 ou 48h d'exposition. Cette observation n'est pas étonnante puisque les récepteurs nicotiques à l'acétylcholine ont été identifiés comme la cible de cette toxine (Araoz et coll., 2011). Or, le modèle cellulaire Caco-2 ne possède pas de récepteurs à l'acétylcholine à la différence des Neuro2A. Par ailleurs, des résultats similaires ont été obtenus avec des cellules KB exposées pendant 72h jusqu'à 100ng/mL de PnTx-G (M. Geiger, communication personnelle). Les modèles cellulaires Caco-2 et Neuro2A, préconisés dans le programme Arcachon pour la partie surveillance des toxicités atypiques, ne possèdent pas ces récepteurs et sont donc inadaptés pour la détection de ce genre de composés comme le vérifie cette étude. Il serait nécessaire de rajouter un modèle de détection avec des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine comme réalisés par Araoz et coll., 2008 et Rodriguez et coll., 2011, ou en utilisant des lignées cellulaires les exprimant largement comme la lignée de phéochromocytome de rat PC12 (Sand et Barish, 2012).

Les extraits du dinoflagellé montrent des toxicités variables en fonction des purifications et des séparations entreprises. L'extrait brut ainsi que l'extrait obtenu après la 1^{ère} purification (F1P1) montrent une toxicité limitée sur les cellules Caco-2

non différenciées (40% de cytotoxicité pour la plus forte concentration testée de 5µg/ml) alors qu'elle est plus marquée sur le modèle neuronal (CI 50 de 0,326 et 0,145µg/mL respectivement). Ces résultats indiquent bien que des composés cytotoxiques autres que la PnTx sont présents dans cet extrait. L'extrait provenant de la 2^e purification (F2P2) entraîne une concentration de la toxicité puisqu'il présente une toxicité supérieure au 1^{er} extrait F1P1 sur les cellules Caco-2 et Neuro2A (CI 50 de 0,025µg/mL). Cet extrait a été séparé en 5 fractions sur lesquelles les tests de cytotoxicité ont permis d'identifier les fractions les plus toxiques : Un classement des fractions par ordre de cytotoxicité peut être effectué : F2P3>F3P3>F4P3>F5P3>F1P3. La fraction F3P3, qui contient la pinnatoxine, a ensuite été fractionnée en 6 autres fractions. Celles-ci ont été classées en fonction de leur réponse cytotoxique : F4P4>F3P4>F1P4>F2P4>F5P4>F6P4. Les études rapportées sur les différentes fractions donnent des renseignements sur la ou les molécule(s) toxique(s) d'intérêt de cette micro algue. De par sa CI50 la plus faible, la fraction F4P4 pourrait contenir une molécule active.

Grâce au couplage entre test biologique et analyse chromatographique, l'identification de composés actifs isolés de *V. rugosum* peut être envisagée et est actuellement en cours par l'Ifremer Nantes.

Quel que soit l'échantillon, aucune toxicité n'est observée sur les cellules Caco-2 différenciées. Au contraire, aux fortes concentrations, on observe régulièrement une augmentation du signal MTT. Cet effet pourrait être lié à une augmentation des capacités métaboliques des cellules provoquée par la majorité des fractions.

D'après ces résultats et les faibles concentrations utilisées, le modèle cellulaire Neuro2A semble le plus approprié pour étudier la cytotoxicité du dinoflagellé. En effet, ces cellules sont généralement considérées comme plus sensibles aux composés neurotoxiques que les lignées cellulaires classiques (LePage et coll., 2005). Pour tous les échantillons provenant de la culture du dinoflagellé, la détermination de CI50 est impossible avec la lignée Caco-2 non différenciée, même après un traitement prolongé jusqu'à 48h. En fait, une baisse de la viabilité est observée pour les différentes fractions, mais elle ne va pas au-delà de 45%. Ceci serait plutôt dû à une diminution de l'activité métabolique, voir un blocage du cycle cellulaire (effet cytostatique) qu'à un effet cytotoxique par mortalité

cellulaire. En effet, l'étude des réponses sur le cycle cellulaire par HCS indique une augmentation du marquage avec Ki67, marqueur du cycle cellulaire présent en phase G1, S ou G2 (Scholzen et Gerdes, 2000). Ainsi il semblerait que les cellules soient bloquées dans une de ces phases, empêchant la mitose cellulaire. Par contre, l'effet de blocage en cycle n'est pas observé avec la pinnatoxine G.

La formation de dommages à l'ADN a également été investiguée sur cette lignée. L'augmentation de H2AX-y, soit aux fortes concentrations soit à toutes les concentrations pour certains échantillons (F1P2, F2P3, F3P3) témoigne de la mise en place de processus de réparation de l'ADN. En effet H2AX-y constitue le signal majeur de recrutement des protéines de réponses aux dommages de l'ADN (Burma et coll., 2001) et est présent de façon proportionnelle aux dommages occasionnés. Il est également impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire puisque sa présence en quantité importante provoque le blocage des cellules en cycle pour permettre la réparation avant d'activer la voie apoptotique via la caspase-3 si les dommages sont trop importants (Huang et coll., 2003). Afin de confirmer l'induction de l'apoptose par les extraits testés, il serait intéressant de réaliser des expériences similaires avec un marquage par un anticorps anti caspase-3. Nos résultats signalent également que la PnTx-G n'entraîne aucun effet sur le marquage H2Ax et par conséquent que ces altérations observées avec les fractions sont provoquées par d'autres molécule(s) présente(s) dans les échantillons.

Des réactions inflammatoires peuvent également être induites par certaines toxines. Le test ELISA permet de mesurer la quantité d'IL-8, médiateur majeur de la réaction inflammatoire, pouvant être sécrété dans le milieu des cellules en culture. Bien que ce test soit négatif sur les autres imines cycliques (Cambell et Coll., 2011), la PnTx-G et les extraits du dinoflagellé ont été testés par cette méthode. Ces expériences ont montré, à l'exception de la fraction F5P3, l'absence de réaction inflammatoire que ce soit par la PnTx-G pure ou par les extraits de dinoflagellé sur les Caco-2 différenciées ou non. La fraction F5P3 entraîne une augmentation de la production d'IL-8 signalant que cette fraction contient une molécule provoquant cette réaction. Des expériences complémentaires seraient à réaliser afin de confirmer ce résultat (dosage de l'ARN de l'IL-8 par PCR quantitative, dosage d'autres médiateurs de l'inflammation (TNF- α , IL-6...)).

Il est également essentiel de disposer d'informations sur la cinétique de la molécule. Etant donné que la toxicité de la pinnatoxine chez la souris ne diffère que très peu entre une administration orale et une administration intrapéritonéale (Munday et coll., 2012), le passage de la barrière intestinale doit être aisé. Ces données toxicocinétiques ont été investiguées *in vitro* par l'utilisation du modèle cellulaire Caco-2, différencié sur inserts. La pinnatoxine G jusqu'à 32ng/ml n'entraîne pas d'altération de l'intégrité de la monocouche de cellules Caco-2 à 2h ou 24h ce qui confirme les résultats de viabilité obtenus avec le test MTT. Les données de cinétique indiquent que cette molécule traverse aisément la barrière de l'épithélium intestinal. La quantité qui traverse augmente avec le temps d'exposition. Une quantité faible a en effet été retrouvée en basal de l'insert après 2h de traitement (1 μ M soit 9% de la quantité disponible en apical) et une quantité plus importante après 24h de traitement (9 μ M soit 65% de la quantité disponible en apical). Aucun effet sur la TEER et une forte perméabilité ont également été retrouvés avec une autre imine cyclique, le 13-desméthyl spirovide C, en utilisant le même modèle *in vitro* (Espina et al 2011). Cependant, à la différence de la PnTxG, les spirovides sont plus de 25 fois moins toxiques après administration orale à la souris comparée à l'injection i.p. (Cembella and Krock, 2008).

L'extrait brut de *Vulcanodinium rugosum* et la fraction F3P3 contenant la PnTx G ont provoqué l'altération de l'intégrité de la monocouche de cellules Caco-2, provoquant une forte diminution de la TEER après 24h d'exposition. Comme aucun effet sur la viabilité des Caco-2 différenciées n'a été observé par le test MTT, il est probable qu'un tel effet soit plutôt lié à un relâchement des jonctions serrées qu'à une mortalité cellulaire. Cependant il faudrait envisager de réaliser d'autres tests de viabilité (Rouge neutre, ..) pour confirmer cette hypothèse. La PnTx-G contenue dans la fraction F3P3 a également traversé la couche cellulaire. 0,9 μ M de PnTx-G a été retrouvée en basal de l'insert après 2h de traitement, soit 23% de la quantité disponible en apical.

Une poursuite de l'étude de cinétique *in vitro* serait à envisager pour compléter ces résultats préliminaires, afin de déterminer si le passage s'effectue de façon passive ou active et si la voie employée est la voie paracellulaire ou transcellulaire (Van Breemen et Li., 2005). Une étude cinétique *in vivo* serait également intéressante. Cependant, une plus grande quantité de toxines serait

nécessaire et cela nécessiterait la mise au point et la validation du dosage de la toxine sur plusieurs organes ou bien d'utiliser une molécule radiomarquée.

D'après les observations *in vitro*, la PnTx-G provoque peu d'effet au niveau intestinal. En effet, elle n'a pas provoqué de cytotoxicité, de blocage du cycle ni d'effet sur l'ADN ou d'effet inflammatoire. Cependant, l'étude de cinétique *in vitro* réalisée a montré un passage aisé de la barrière intestinale. Ainsi, selon les résultats obtenus, peu d'effets sur l'intestin sont attendus chez l'homme après ingestion de la PnTxG. Par contre, le passage aisé de la barrière intestinale favorise une large disponibilité systémique avec en particulier des effets préconisés sur le système nerveux. Des tests spécifiques des fonctions neuronales tels que la neurotransmission, l'activité électrique, l'activation de récepteurs et de canaux spécifiques pourront être envisagés. En revanche, d'autres composés actifs sont présents dans les extraits du dinoflagellé *V. rugosum*. La recherche de ces composés est actuellement en cours et pourrait amener à la découverte de nouvelles substances à visée thérapeutique.

Bibliographie

- Araoz, R.**, Herdman, M., Rippka, R., Ledreux, A., Molgó, J., Changeux, J.P., Tandeau de Marsac, N., Nghiê, H.O.. 2008. A non-radioactive ligand-binding assay for detection of cyanobacterial anatoxins using Torpedo electrocyte membranes. *Toxicon* 52: 163-174.
- Araoz, R.**, Servent, D., Molgo, J., Iorga, B.I., Fruchart-Gaillard, C., Benoit, E., Gu, Z., Stivala, C., Zakarian, A.. 2011. Total Synthesis of Pinnatoxins A and G and Revision of the Mode of Action of Pinnatoxin A. *J A Chem Soc* 133: 10499–10511.
- Artursson, P.**, Palm, K., Luthman, K.. 2001. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev* 1: 27-43.
- Botana, L.M.**, Alfonso, A., Botana, A., Vieytes, M.R., Vale, C., Vilariño, N., Louzao, C.. 2009. Functional assays for marine toxins as an alternative, high-throughput screening solution to animal tests. *TrAC* 18: 603-611.
- Bourne, Y.**, Radic, Z., Araoz, R., Talley, T., Benoit, E., Servent, D., Taylor, P., Molgo, J., Marchot, P.. 2010. Structural determinant in phycotoxins and AChBP conferring high affinity binding and nicotinic AChR antagonism. *PNAS* 107: 6076-6081.
- Burma, S.**, Chen, B.P., Murphy, M., Kurimasa, A., Chen, D.J.. 2001. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 276(45): 42462-7.
- Cambell, K.**, Vilariño, N., Botana, L.M., Elliott, C.T.. 2011. A European perspective on progress in moving away from the mouse bioassay for marine-toxin analysis. *TrAC* 30: 239-253.
- Cembella, A.D.**, Krock, B.. 2008. Cyclic Imine Toxins: Chemistry, Biogeography, Biosynthesis, and Pharmacology. In: Botana, L.M., (Ed.), *Seafood and Freshwater Toxins, Pharmacology, Physiology, and Detection*, CRC Press Taylor and Francis Group, pp. 561–580.
- Costa, L.G.**. 1998. Neurotoxicity testing: a discussion of in vitro alternatives. *Environ Health Perspect Suppl* 106: 505-510.
- Chou, T.**, Haino, T., Kuramoto, M., Uemura, D.. 1996. Isolation and Structure of Pinnatoxin D, a New Shellfish Poison from the Okinawan Bivalve *Pinna muricata*. *Tetrahedron Lett* 37: 4027-4030.
- Coussens, L.M.**, Werb, Z.. 2002. Inflammation and cancer. *Nature* 420: 860-867.
- Draisci, R.**, Palleschi, L., Giannetti, L., Lucentini, L., James, K.J., Bishop, A.G., Satake, M., Yasumoto, T.. 1999. New approach to the direct detection of known and new diarrhoeic shellfish toxins in mussels and phytoplankton by liquid chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A* 847: 213-221.
- EFSA panel on contaminants in the food chain (CONTAM)**, 2010. scientific opinion on marine biotoxins in shellfish – Cyclic imines (spirolides, gymnodimines, pinnatoxins and pteritoxins). *EFSA journal* 8: 1628-1667.

- Espiña, B., Otero, P., Louzao, M.C., Alfonso, A., Botana, L.M.**. 2011. 13-Desmethyl spirolide-c and 13,19-didesmethyl spirolide-c trans-epithelial permeabilities: human intestinal permeability modelling. *Toxicology* 287: 69-75.
- Fotakis, G.,** Timbell, J.A.. 2006. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett* 160: 171-177.
- Giuliano, K.A.,** DeBiasio, R.L., Dunlay, R.T., Gough, A., Volosky, J.M., Zock, J., Pavlakis, G.N., Taylor, D.L.. 1997. High-Content Screening: A New Approach to Easing Key Bottlenecks in the Drug Discovery Process. *J Biomol Screen* 2: 249-259.
- Hamid, R.,** Rotshteyn, Y., Rabadi, L., Parikh, R., Bullock, P..2004. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicol In Vitro* 18:703-10.
- Hallegraeff, G.M.,** Bolch, C.J..1991. Transport of toxic dinoflagellate cysts via ships' ballast water. *Mar Poll Bull* 22: 27-30.
- Hellyer, S.D.,** Selwood, A.I., Rhodes, L., Kerr, D.S.. 2011. Marine algal pinnatoxins E and F cause neuromuscular block in an in vitro hemidiaphragm preparation. *Toxicon* 58: 693-699.
- Hilgendorf, C.,** Ahlin, G., Seithel, A., Artursson, P., Ungell, A.L., Karlsson, J.. 2007. Expression of Thirty-six Drug Transporter Genes in Human Intestine, Liver, Kidney, and Organotypic Cell Lines. *Drug Metab Dispos* 35: 1333–1340.
- Huang, X.,** Traganos, F., Darzynkiewicz, Z.. 2003. DNA damage induced by DNA topoisomérase I- and DNA topoisomérase II- inhibitors detected by histone H2AXphosphorilation in relation to the cell cycle phase and apoptosis. *Cell cycle* 2: 614-619.
- Ifremer,** 2006. Phytoplancton et phycotoxines, bilan des connaissances générales. La surveillance dans le bassin d'Arcachon. Archives IFREMER.
- Ifremer,** 2008 : rephy espèces toxiques et toxines : synthèse sur 10 ans. Archives IFREMER.
- Ifremer,** 2011. Recherche de toxines lipophiles et de pinnatoxines par CL-SM/SM, en complément du bio-essai sur souris. Rapport Pinnatoxines n°8.
- Kogure, K.,** Tamplin, M.L., Simidu, U., Colwell, R.R.. 1988. A tissue culture assay for tetrodotoxin, saxitoxin and related toxins. *Toxicon* 26: 191-197.
- Lequin, R.M.** 2005. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinchem* 51: 2415-2418.
- Ledreux, A.,** Krys, S., Bernard, C.. 2009. Suitability of the Neuro-2a cell line for the detection of palytoxin and analogues (neurotoxic phycotoxins). *Toxicon* 53: 300-308.
- Ledreux, A.,** Sérandour, A.L., Morin, B., Derick, S., Lanceleur, R., Hamlaoui, S., Furger, C., Biré, R., Krys, S., Fessard, V., Troussellier, M., Bernard, C.. 2012. Collaborative study for the detection of toxic compounds in shellfish extracts using cell-based assays. Part II: application to shellfish extracts spiked with lipophilic marine toxins. *Anal Bioanal Chem* 403: 1995-2007.

- LePage, K.T.**, Dickey, R.W., Gerwick, W.H., Jester, E.L., Murray, T.F.. 2005. On the use of Neuro-2a neuroblastoma cells versus intact neurons in primary culture for neurotoxicity studies. *Crit Rev Neurobiol* 17: 27-50.
- McNabb, P.S.**, Mc Coubrey, D.J., Rhodes, L., Smith, K., Selwood, A.I., Van Ginkel, R., MacKenzie, A.L., Munday, R., Holland, P.T.. 2012. New perspectives on biotoxin detection in Rangaunu Harbour, New Zealand arising from the discovery of pinnatoxins. *Harm Algae* 13: 34–39.
- Munday, R.**, Selwood, A.I., Rhodes, L.. 2012. Acute toxicity of pinnatoxins E, F and G to mice. *Toxicon* 60: 995-999.
- Natoli, M.**, Leoni, B.D., D’Agnano, I., Zucco, F., Felsani, A.. 2012. Good Caco-2 cell culture practices. *Toxicol in vitro*.
- Nézan, E.**, Chomérat, N., 2011. *Vulcanodinium rugosum* gen. et sp. nov (Dinophyceae), un nouveau dinoflagellé marin de la côte méditerranéenne française. *Cryptogam algol* 32: 3-18.
- Otero, A.**, Chapela, M.J., Atanassova, M., Vieites, J.M., Cabado, A. G.. 2011. Cyclic Imines : chemistry and mechanism of action. *Chem Res Toxicol* 24: 1817-1829.
- Pinto, M.**, Robine-Leon, S., Appay, M.D., Kedingler, M., Triadou, N., Dussaulx, E., Lacroix, B., Simon-Assman, P., Haffen, K., Fogh, J., Zweibaum, A.. 1983. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human-colon carcinoma cell-line Caco-2 in culture *Biol Cell* 47: 323-333.
- Rhodes, L.**, Smith, K., Selwood, A., McNab, P., Munday, R., Suda, S., Molenaar, S., Hallegraeff, G.M.. 2011. Dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum* identified as the causative organism of pinnatoxins in Australia, New Zealand and Japan. *Phycologia* 50: 624-628.
- Rodriguez, L.P.**, Vilariño, N., Molgó, J., Aráoz, R., Antelo, A., Vieytes, M.R., Botana, L.M.. 2011. Solid-phase receptor-based assay for the detection of cyclic imines by chemiluminescence, fluorescence, or colorimetry. *Anal Chem* 83: 5857-5863.
- Rundberget, T.**, Bunæs Aasen, J.A., Selwood, A.I., Miles, C.O.. 2011. Pinnatoxins and spirolides in Norwegian blue mussels and seawater. *Toxicon* 58: 700-711.
- Sands, S.B.**, Barish, M.E.. 1992. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor currents in phaeochromocytoma (PC12) cells: dual mechanisms of rectification. *J Physiol* 447: 467-487.
- Sérandour, A.L.**, Ledreux, A., Morin, B., Derick, S., Augier, E., Lancelleur, R., Hamlaoui, S., Moukha, S., Furger, C., Biré, R., Krys, S., Fessard, V., Troussellier, M., Bernard, C.. 2012. Collaborative study for the detection of toxic compounds in shellfish extracts using cell-based assays. Part I: screening strategy and pre-validation study with lipophilic marine toxins. *Anal Bioanal Chem* 403:1983-93.
- Selwood, A.**, Miles, C.O., Wilkins, A.L., Ginkel, R.V., Munday, R., Rise, F., McNabb, P.. 2010. Isolation, structural determination and acute toxicity of pinnatoxins E, F, and G. *J Agric Food Chem* 58: 6532-6542.
- Scholzen, T.**, Gerdes, J.. 2000. The Ki67 protein: From the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182: 311-322

Smith, K.F., Rhodes, L., Suda, S., Selwood, A.I.. 2011. A dinoflagellate producer of pinnatoxin G, isolated from sub-tropical Japanese waters. *Harm Algae* 10: 702-705.

Sonoda, Y., Kasahara, T., Yamaguchi, Y., Kuno, K., Matsushima, K., Mukaida, N.. 1997. Stimulation of Interleukin-8 Production by Okadaic Acid and Vanadate in a Human Promyelocyte Cell Line, an HL-60 Subline. *J Biol Chem* 272): 15366-15372.

Stivala, C.E., Zakarian, A.. 2007. Studies toward the synthesis of pinnatoxins: the spiroimine fragment. *Tetrahedron Lett* 48: 6845–6848.

Sun, H., Pang, K.S.. 2008. Permeability, transport and metabolism of solutes in Caco-2 cell monolayers: A theoretical study. *Drug Metab Dispos* 36: 102-123.

Uemura, D., Chou, T., Haino, T., Nagatsu, A., Fukuzawa, S., Zheng, S., Chen, H.. 1995. Pinnatoxin A : a toxic amphoteric macrocycle from okinawan bivalves *Pinna muricata*. *J Am Chem Soc* 117: 1155-1156.

Van Breemen, R., Li, Y.. 2005. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opin. Drug Metab Toxicol* 1 : 175-185.

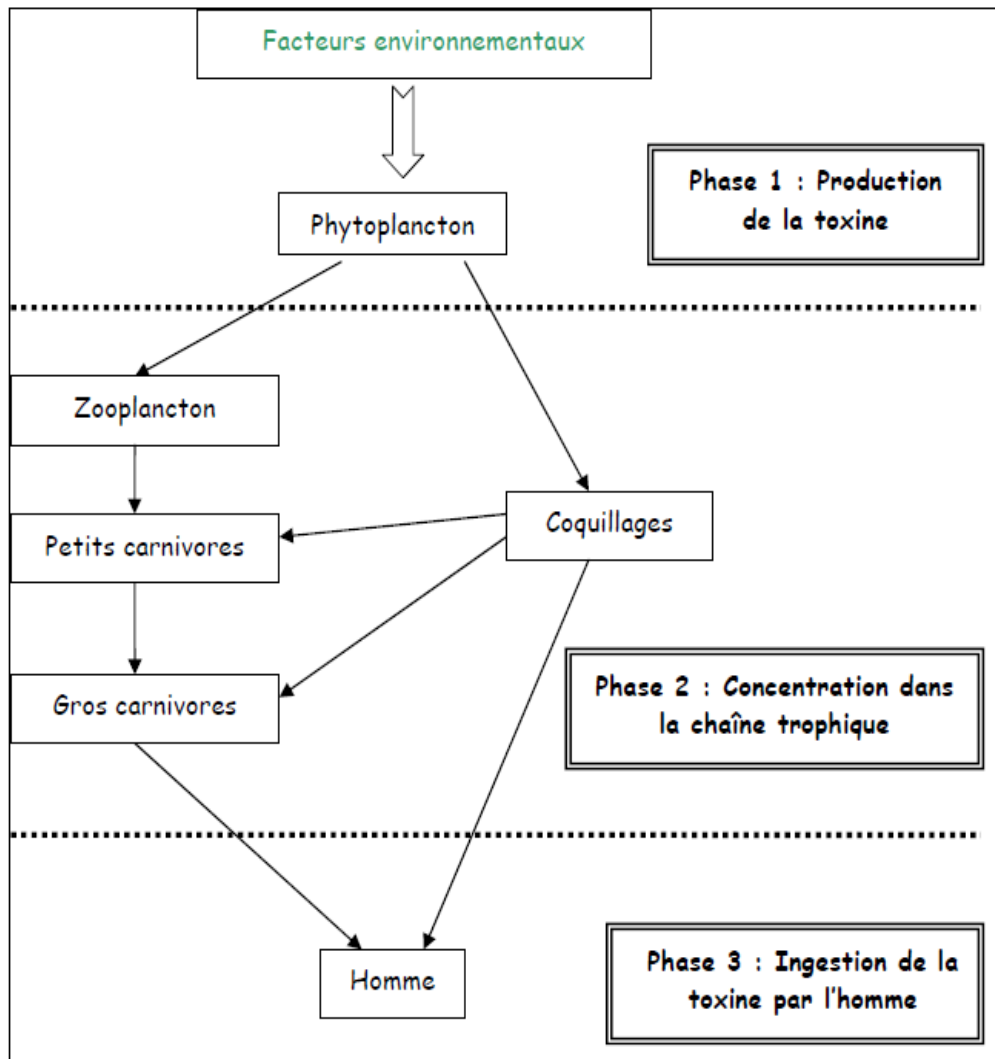
Directive 91/492/CEE du Conseil, du 15 juillet 1991, fixant les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché de mollusques bivalves vivants. JO L 268 du 24.09.1991 : 1–14.

Rectificatif au règlement (CE) no 854/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 fixant les règles spécifiques d'organisation des contrôles officiels concernant les produits d'origine animale destinés à la consommation humaine. JO L 139 du 30.04.2004.

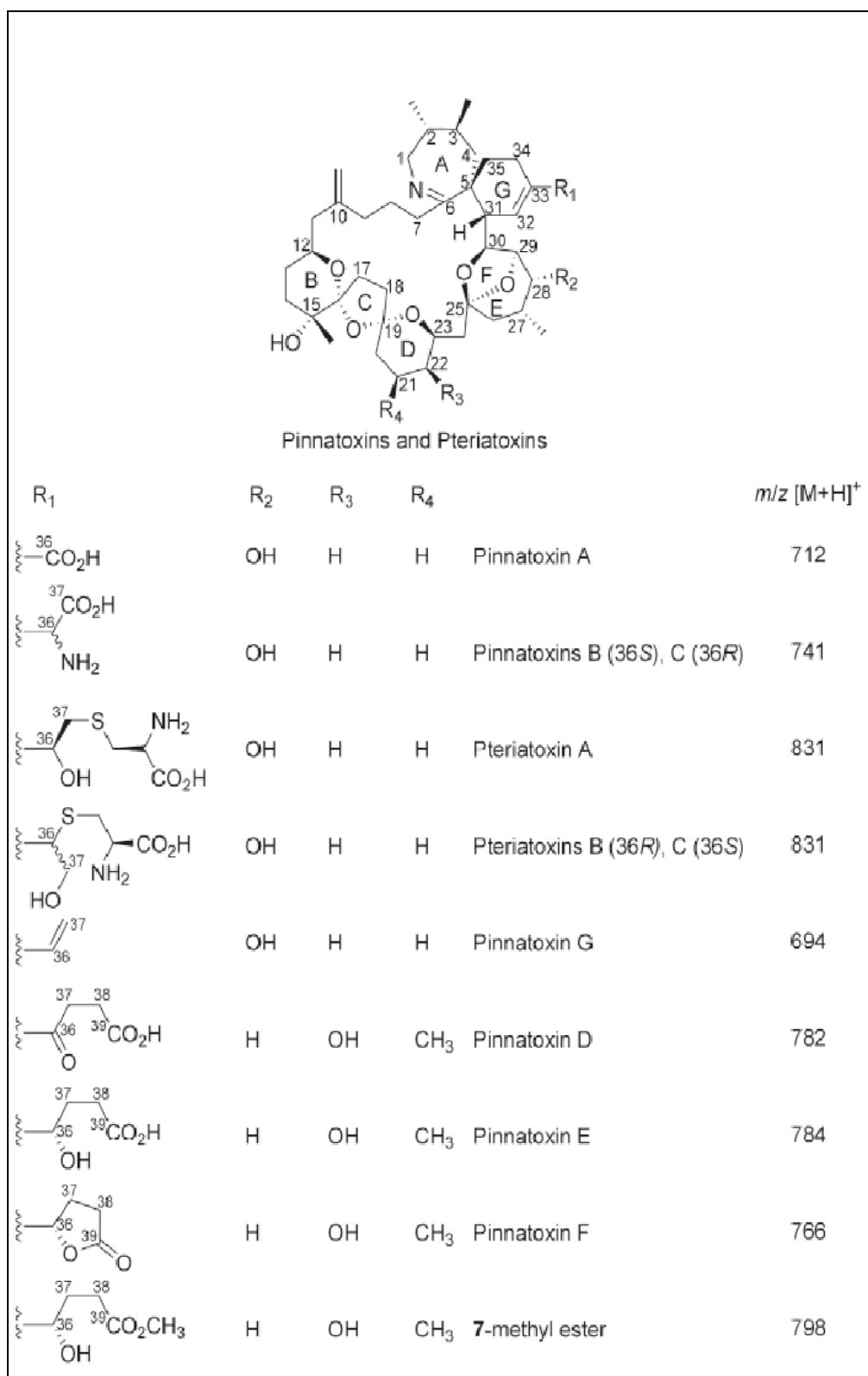
RÈGLEMENT (CE) No 2074/2005 de la commission du 5 décembre 2005 établissant les mesures d'application relatives à certains produits régis par le règlement (CE) no 853/2004 du Parlement européen et du Conseil et à l'organisation des contrôles officiels prévus par les règlements (CE) no 854/2004 du Parlement européen et du Conseil et (CE) no 882/2004 du Parlement européen et du Conseil, portant dérogation au règlement (CE) no 852/2004 du Parlement européen et du Conseil et modifiant les règlements (CE) no 853/2004 et (CE) no 854/2004. JO L 338 du 22.12.2005 : 27.

Annexes

Annexe 1 : Schéma de contamination de l'homme par les phycotoxines.



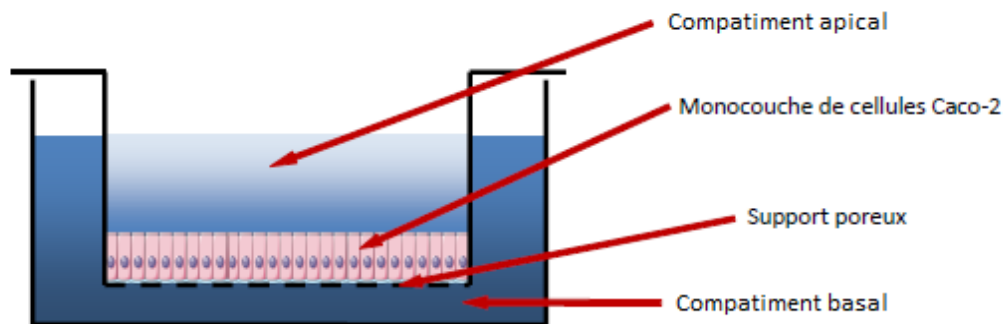
Annexe 2 : Structure des différentes pinnatoxines et pteriatoxines. *D'après Selwood et coll. 2010.*



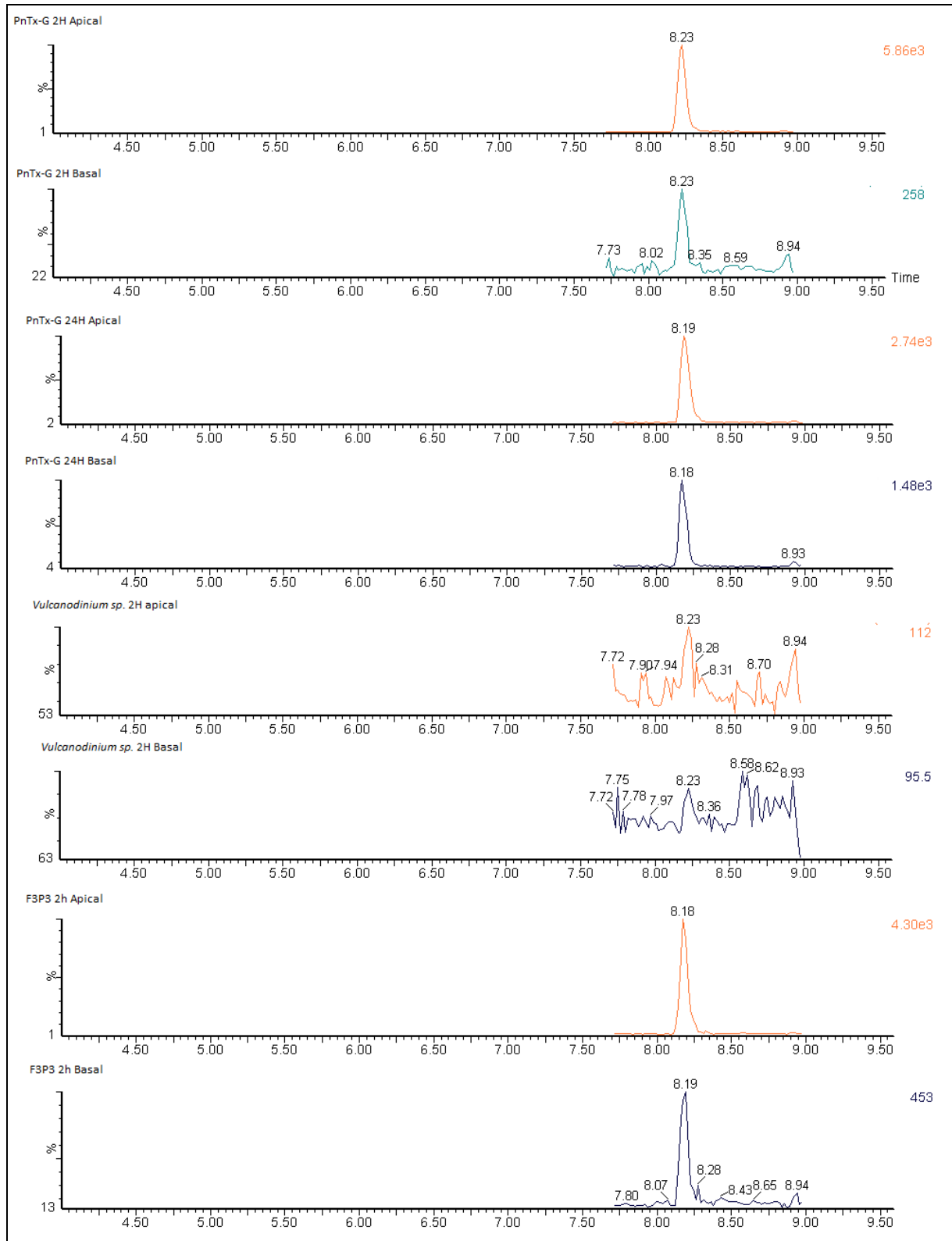
Annexe 3 : Tampon carbonate

1,59g NaCo3 30mM (Merck)
2.94g NaHCo3 70 mM (Merck)
500 mL eau ultra pure
pH 9,6

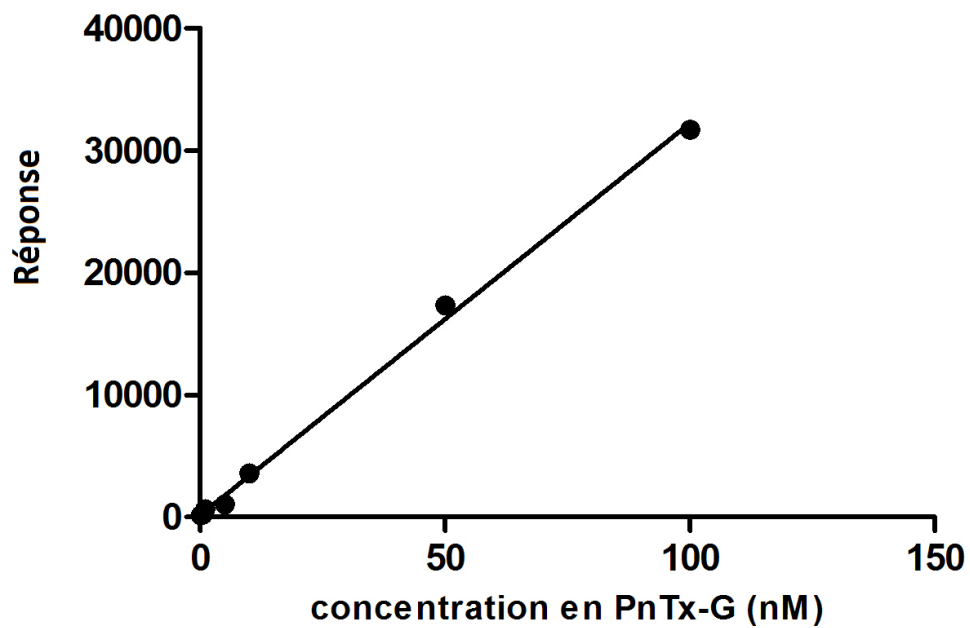
Annexe 4 : Schéma d'un insert avec une monocouche de cellules Caco-2 différenciées.



Annexe 5: Chromatogrammes résultant de l'analyse par LC-MS des échantillons prélevés en apical et en basal de la monocouche cellulaire Caco-2 après 2h et 24h de traitement par la PnTx-G et après 2h de traitement par l'extrait brut de *Vulcanodinium rugosum* et par la fraction F3P3.



Annexe 6: Droite de calibration utilisant un standard de PnTx-G.



Le r^2 est supérieur à 0,99. L'équation de la droite est la suivante : $Y=320X$

Résumé

Les phycotoxines peuvent provoquer des intoxications alimentaires chez l'homme. Parmi celles-ci, les pinnatoxines, du groupe des imines cycliques, sont produites par le dinoflagellé *Vulcanodinium rugosum* et ont depuis peu été détectées en Europe. Elles agissent sur les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine mais peu de données sont disponibles concernant leur toxicité.

Des études pour évaluer la toxicité *in vitro* de la pinnatoxine G et d'extraits de culture de *V. rugosum* ont été réalisées sur deux modèles cellulaires intestinal (Caco2) et neuronal (Neuro2A). La cytotoxicité, l'inflammation, et l'absorption de la toxine à travers la barrière intestinale ont été mesurées de même que les effets génotoxiques et sur le cycle cellulaire par High Content Screening.

La pinnatoxine G n'a entraîné aucun effet sur chacun des tests effectués. Elle est cependant largement absorbée par l'épithélium intestinal. La plupart des extraits de *V. rugosum* sont cytotoxiques sur Neuro2A, induisant un blocage du cycle cellulaire et l'induction de dommages à l'ADN mais sans provoquer d'inflammation sur Caco2.

L'évaluation du danger par ingestion des pinnatoxines nécessite des études complémentaires du fait de leur forte perméabilité. De plus, les cultures de *V. rugosum* contiennent d'autres produits toxiques qu'il reste à identifier.

Mots clés : Toxicité ; pinnatoxine G ; *Vulcanodinium rugosum* ; Caco-2 ; Neuro2A

Annexe 5 : Toxicité in vivo de la Pinnatoxine G (Rex Munday)



Acute toxicity of pinnatoxins E, F and G to mice

Rex Munday^{a,*}, Andrew I. Selwood^b, Lesley Rhodes^b

^a AgResearch Ltd, Ruakura Research Centre, Private Bag 3123, Hamilton, New Zealand

^b Cawthron Institute, Private Bag 2, Nelson, New Zealand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 April 2012

Received in revised form 4 July 2012

Accepted 10 July 2012

Available online 16 July 2012

Keywords:

Pinnatoxins

Cyclic imines

Acute toxicity

ABSTRACT

The acute toxicities to mice of pinnatoxins E, F and G, members of the cyclic imine group of phycotoxins, by intraperitoneal injection and/or oral administration, have been determined. These substances were all very toxic by intraperitoneal injection, with LD₅₀ values between 12.7 and 57 µg/kg. Pinnatoxin E was much less toxic by oral administration than by intraperitoneal injection, but this was not the case for pinnatoxin F. The median lethal doses of the latter substance by gavage and by voluntary intake were only 2 and 4 times higher than that by injection. The high oral toxicity of pinnatoxin F raises concerns as to the possibility of adverse effects of this substance in shellfish consumers, although it should be noted that no toxic effects in humans have been recorded with pinnatoxins or with any other compound of the cyclic imine group.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Pinnatoxins are members of the cyclic imine group of marine toxins. A compound named “pinnatoxin” was first isolated from *Pinna attenuata* from the South China Sea in 1990, although this substance was not characterised (Zheng et al., 1990). Five years later, pinnatoxin A from the Okinawan bivalve mollusc *Pinna muricata* was isolated and its structure determined (Uemura et al., 1995), and pinnatoxins B–D from the same source were described in subsequent publications (Chou et al., 1996; Takada et al., 2001). After this, no more reports on pinnatoxins were published until 2010, when, following unusual results in routine mouse bioassays, pinnatoxin A, and two new derivatives, pinnatoxins F and G, were detected in extracts of Pacific oysters from South Australia (Selwood et al., 2010). Isolates of a peridinoid dinoflagellate, named *Vulcanodinium rugosum* (Nézen and Chomérat, 2011), from New Zealand, Australia, Japan and Australia were shown to produce pinnatoxins (Rhodes et al., 2010, 2011a, b), and the presence of pinnatoxins in shellfish has now been described not

only in samples from Australia, New Zealand and Japan but also from Scandinavia (Rundberget et al., 2011) and Canada (McCarron et al., 2012).

Pinnatoxins are highly toxic to mice by intraperitoneal injection (Uemura et al., 1995; Chou et al., 1996; McCauley et al., 1998; Takada et al., 2001; Selwood et al., 2010), and crude extracts of *V. rugosum* were similarly toxic by this route (Rhodes et al., 2010, 2011b). Surprisingly, however, the toxicities of such extracts by oral administration were also high, with LD₅₀ values by gavage only 2–3 times higher than those by intraperitoneal injection (Rhodes et al., 2010, 2011b). In order to provide further information on the toxicity of pinnatoxin derivatives, we have determined the acute toxicity of pure samples of pinnatoxins E, F and G by various routes of administration.

2. Materials and methods

2.1. Culture of the organism

Clonal isolates of *V. rugosum* (Cawthron Institute Culture Collection of Micro-Algae, isolate CAWD183) were cultured at 25 °C in K medium (Keller et al., 1987). Five-litre batch cultures were grown in sterile plastic bags with inserts

* Corresponding author. Tel.: +64 7 838 5138; fax: +64 7 838 5012.

E-mail address: rex.munday@agresearch.co.nz (R. Munday).

containing 0.6 M K_2CO_3 /2.4 M $KHCO_3$ in deionised water, as previously described (Rhodes et al., 2011a).

2.2. Isolation of pinnatoxins E and F

1.5 kg of a cyanobacterial mat, identified as *Lyngbya majuscula*, was collected in March 2009 from Rangaunu Harbour, Northland, New Zealand. Such mats have been shown to contain high concentrations of pinnatoxins, which are believed to result from sequestration of these substances from *V. rugosum* in the cyanobacterial sheaths (Rhodes et al., 2010). The mat was lyophilised, ground to a fine powder and packed into a stainless steel column. 1.15 L of methanol was pumped through the column at a flow rate of 2–10 ml/min, and the eluate collected in five fractions. The pinnatoxins were largely (95%) contained in the first 400 ml of eluate. This was filtered through a GFC filter, followed by filtration through Whatman 542 paper. The methanol was removed *in vacuo* at 30 °C to afford 24 g of a dark green residue. Pinnatoxins E and F were separated and purified from this residue by liquid–liquid partitioning, flash column chromatography and high-performance liquid chromatography, as described previously (Selwood et al., 2010). The identity and purity of the pinnatoxins were confirmed by NMR and LC-MS.

2.3. Isolation of pinnatoxin G

Pinnatoxin G was isolated from the culture of *V. rugosum*. Cells were harvested from 60 L of culture and lyophilised. The dry cells were sonicated in 300 ml of methanol. The mixture was centrifuged at 3200 g for 10 min, and the pellet extracted with a further 150 ml of methanol. After centrifugation, the solvent was removed from the combined supernates *in vacuo* at 30 °C, yielding 2.4 g of residue. From this, pinnatoxin G was extracted and characterised as described above.

2.4. Determination of acute toxicities

Female Swiss albino mice, bred at Ruakura, of initial body weight 18–22 g, were employed in all experiments. They were housed in solid-bottomed cages containing bedding of softwood shavings. In most experiments, the animals were allowed unrestricted access to food (Rat and Mouse Cubes, Speciality Feeds Ltd, Glen Forrest, Western Australia). These animals are referred to as “fed mice”. In some experiments, however, mice were deprived of food for 16 h before dosing (“fasted mice”). Food was returned to these animals immediately after dosing. All mice had free access to tap water throughout the experimental period. All experiments were approved by the institutional Animal Ethics Committee.

Acute toxicities were determined according to the principles of OECD Guideline 425 (OECD, 2008) and LD_{50} values and 95% confidence intervals were calculated using the AOT 425 Statistical Program (USEPA, 2002). The No Observable Adverse Effect Levels (NOAELs) of the pinnatoxins were determined by administering a decreasing logarithmic progression of doses below the LD_{50} . Mice were weighed immediately before dosing, and the test

substances were administered on a $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight basis. The test compounds were dissolved in ethanol, and diluted in 1% Tween 60 in saline for administration by intraperitoneal injection or by gavage.

For intraperitoneal injection, aliquots were diluted to 1 ml, with a constant ethanol content of 5% v/v. For gavage, aliquots were diluted to 200 μl , with an ethanol content of 12.5% v/v. For determination of toxicity by voluntary consumption, fasted mice were given the test compound absorbed on a small piece of dry mousefood (Munday et al., 2004). Alternatively, mice were trained over a 1-week period to eat small aliquots (~ 150 mg) of either cream cheese (Tararua Traditional Cream Cheese, Goodman Fielder New Zealand Ltd, Auckland, New Zealand) or a mixture containing 53% Kraft Light Smooth Peanut Butter (Kraft Foods Ltd, Freemans Bend, Victoria, Australia), 10% casein and 37% sucrose. After training, the cream cheese or peanut butter mix vehicles were eagerly and rapidly consumed by both fed and fasted mice. For dosing, an ethanolic solution of the test substance was mixed with the food, and immediately fed to the mice. The solutions were prepared immediately before dosing, in order to avoid any possible hydrolysis of pinnatoxin F (Selwood et al., 2010). All dosing was conducted between 8.00 and 9.30 a.m., and the mice were monitored intensively during that day. Those dying during the course of the experiment were necropsied, while survivors were examined each day for 14 days after dosing, after which time they were killed and necropsied.

3. Results

The acute toxicities of pinnatoxins E, F and G by intraperitoneal injection are shown in Table 1. Pinnatoxin F was significantly more toxic by intraperitoneal injection than the other pinnatoxin derivatives, while the acute toxicities of pinnatoxins E and G were not significantly different. Fasting had no significant effect on the acute intraperitoneal toxicity of the pinnatoxins. Mice injected with lethal doses of these substances were initially very active. After 15–20 min, however, the animals became progressively less active, moving with an unsteady gait with their hind legs partially extended. Abdominal breathing was also noted at this time. The mice subsequently became prostrate, and their respiration rates progressively declined until breathing ceased completely. Cyanosis and exophthalmia were noted shortly before death, which occurred 30–50 min after dosing. At toxic, but sub-lethal doses ($\sim 75\%$ of

Table 1
Median lethal doses of pinnatoxins E, F and G by intraperitoneal injection.

Compound	State of alimentionation	LD_{50} ($\mu\text{g}/\text{kg}$) ^a	NOAEL ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Pinnatoxin E	Fed	57.0 (39.7–75.3)	22.0
Pinnatoxin E	Fasted	48.0 (33.5–63.5)	ND ^b
Pinnatoxin F	Fed	12.7 (9.5–14.6)	3.2
Pinnatoxin F	Fasted	14.9 (12.6–15.8)	ND ^b
Pinnatoxin G	Fed	48.0 (36.3–68.1)	18.8
Pinnatoxin G	Fasted	42.7 (40.0–50.0)	ND ^b

^a Figures in brackets indicate 95% confidence intervals.

^b Not determined.

the LD₅₀) mice were again active for 20–25 min. Activity subsequently decreased, and after a brief period of rapid abdominal breathing, the respiration rate declined to sub-normal levels (~100 breaths/minute). Respiration rates normalised after 1–1.5 h. At this time, mice were lethargic, with piloerection, but their appearance and behaviour became normal after 2–3 h, and remained normal throughout the remainder of the subsequent observation period. No effects were observed in mice injected with pinnatoxins E, F or G at 25–39% of the median lethal dose. No abnormalities were observed at necropsy.

The acute toxicities of pinnatoxins E, F and G by gavage are given in Table 2. Pinnatoxin F was half as toxic by gavage as by intraperitoneal injection, while pinnatoxin G was 3 times less toxic. In contrast, pinnatoxin E was 49 times less toxic by gavage than by injection. The symptoms of intoxication following gavage were very similar to those recorded after intraperitoneal injection, although the time to onset of inactivity and abdominal breathing at lethal doses, and the time to death, were greater in animals dosed by gavage, occurring at 25–40 min and ~1.3 h after dosing respectively. There was no significant difference in the acute toxicity of pinnatoxin F in fed or fasted mice, although the time to onset of signs of toxicity and of death in fasted animals were approximately half those recorded in fed mice. The NOAELs after gavage in relation to acute toxicity were similar to those seen after injection, being 21–50% of the median lethal dose. Again, mice dosed with the pinnatoxins at sub-lethal doses made a complete recovery, and they remained normal throughout the observation period. No abnormalities were observed at necropsy.

Insufficient pinnatoxin E was available for determination of the LD₅₀ by voluntary intake, but the acute toxicities of pinnatoxins F and G by this route are shown in Table 3. The median lethal doses of these substances were higher by this route of administration than those recorded for gavage, but only by factors of 2.0 and 2.7 respectively. There was no significant difference in the acute toxicity of pinnatoxin F among any of the vehicles employed for administration. No effects were observed with pinnatoxin F and pinnatoxin G at 32 and 38% of the lethal dose respectively.

4. Discussion

While originally identified only in Japan, recent studies indicate that shellfish in many parts of the world may be contaminated with pinnatoxins. We have previously reported the acute intraperitoneal toxicity of pinnatoxins E, F and G in mice (Selwood et al., 2010), although this is not the route whereby humans will be exposed to the

Table 2
Median lethal doses of pinnatoxins E, F and G by gavage.

Compound	State of alimentation	LD ₅₀ (µg/kg) ^a	NOAEL (µg/kg)
Pinnatoxin E	Fed	2800 (2380–3000)	600
Pinnatoxin F	Fed	25.0 (19.1–35.1)	9.9
Pinnatoxin F	Fasted	29.9 (25.0–32.0)	ND ^b
Pinnatoxin G	Fed	150 (105–199)	75

^a Figures in brackets indicate 95% confidence intervals.

^b Not determined.

Table 3
Median lethal doses of pinnatoxins F and G by voluntary intake.

Compound	State of alimentation	Vehicle	LD ₅₀ (µg/kg) ^a	NOAEL (µg/kg)
Pinnatoxin F	Fed	Cream cheese	50.0 (39.4–62.8)	16.0
Pinnatoxin F	Fed	Peanut butter mix	50.0 (37.9–71.5)	ND ^b
Pinnatoxin F	Fasted	Cream cheese	77.0 (NC ^c)	ND ^b
Pinnatoxin F	Fasted	Peanut butter mix	50.0 (39.4–62.8)	ND ^b
Pinnatoxin F	Fasted	Mousefood	50.0 (37.9–71.5)	ND ^b
Pinnatoxin G	Fed	Cream cheese	400 (380–470)	153

^a Figures in brackets indicate 95% confidence intervals.

^b Not determined.

^c Not calculated. The pattern of deaths in this experiment was such that confidence limits could not be calculated by the AOT program.

pinnatoxins. The route of administration of chemicals has a major influence on their rate and degree of absorption and on their exposure to bodily defence mechanisms, such as detoxification processes in the intestine and liver, and it is recognised that for risk assessment, the route employed should be that by which humans are exposed (Gad, 1994). We have therefore extended our studies to compare the acute toxicities of these pinnatoxins by gavage and/or by voluntary intake with those by intraperitoneal injection.

As mentioned previously, extracts of *V. rugosum* were unusually toxic by oral administration, and this observation is supported by the results of the present investigation with the purified pinnatoxins. The relatively small differences among the median lethal doses of these substances when dosed by the various routes of administration are unusual among cyclic imines, as shown by the data of Table 4. By intraperitoneal injection, all the cyclic imines so far studied have been shown to be highly toxic, with LD₅₀s below 100 µg/kg. The most toxic compounds by this route were 20-methyl spiroside G and spiroside C and its 13-desmethyl derivative, closely followed by pinnatoxin F. Gymnodimine and the spiroside were 8–23 times less toxic by gavage than by injection, while pinnatoxin E was 49 times less toxic. Compounds

Table 4
Acute toxicity of cyclic imines by various routes of administration.

Compound	LD ₅₀ by intraperitoneal injection (µg/kg)	LD ₅₀ by gavage (µg/kg)	LD ₅₀ by voluntary consumption (µg/kg)	Reference
Pinnatoxin E	57	2800	–	This work
Pinnatoxin F	12.7	25.0	50	This work
Pinnatoxin G	48	150	400	This work
Gymnodimine	96	755	>7500	Munday et al., 2004
Spiroside A	37	550	1300	Munday et al., 2012
Spiroside C	8.0	180	780	Munday et al., 2012
13-Desmethyl spiroside C	6.9	130	1000	Munday et al., 2012
20-Methyl spiroside G	8.0	88	630	Munday et al., 2012

administered by intraperitoneal injection are rapidly and extensively absorbed, leading to high acute toxicity. The relatively low toxicities by gavage seen with gymnodimine and the spirolides most likely reflect slower and/or less extensive absorption from the gastrointestinal tract. The low oral toxicity of pinnatoxin E is also likely to be attributable to decreased absorption, due to the opening of the lactone ring to form the more hydrophilic carboxylic acid. In contrast, the LD₅₀ of pinnatoxin F by gavage was only twice that by intraperitoneal injection, suggesting effective absorption from the gastrointestinal tract. Furthermore, pinnatoxin G, although significantly less toxic than 20-methyl spirolide G and the spirolides C by injection, was of similar toxicity to these compounds when administered by gavage, again suggesting differences in absorption. It has been argued (Munday, 2006) that gavage may give a spuriously high estimate of oral toxicity in mice, since the semi-solid nature of the mouse stomach contents allows the solution of the test material to flow directly into the small intestine, thus facilitating rapid absorption and relatively high toxicity. This situation is quite different to that pertaining in the human stomach, in which the liquid contents permit the uniform distribution of ingested material, leading to gradual passage into the absorptive areas of the intestine. The Codex Alimentarius Commission (Codex, 2006) suggested that administration of toxins to mice via voluntary consumption would provide a more valid estimate of the LD₅₀, since this leads to mixing of the test compound with the stomach contents of the animals, as occurs in the human situation. Such considerations do not explain, however, the high toxicity of pinnatoxin F by gavage, since this substance was also highly toxic by voluntary consumption. The use of different vehicles (mousefood, cream cheese or a peanut butter mix) had no significant effect on the LD₅₀ by this route, and by voluntary consumption pinnatoxin F was by far the most toxic of the cyclic imines so far tested, with an LD₅₀ of only 50 µg/kg, and with adverse effects being recorded at doses greater than 16 µg/kg.

Members of the cyclic imine group are fast-acting toxins, which cause death through respiratory failure. These substances are believed to exert their toxic effects in animals through inhibition of neuromuscular transmission, leading to muscular paralysis (Kharrat et al., 2008; Bourne et al., 2010; Hauser et al., 2012). The same mechanism of toxicity for pinnatoxins is indicated by the recent observation that twitch responses to nerve stimulation in the mouse phrenic hemidiaphragm preparation were blocked by pinnatoxin F and by a mixture of pinnatoxin E and F at nanomolar concentrations (Hellyer et al., 2011). The observed progressive decline in respiration rates, leading to death by asphyxia, is consistent with inhibition of neuromuscular transmission, leading to paralysis of the diaphragm. Similar clinical signs and death from respiratory failure have been seen with other compounds that inhibit neuromuscular transmission, such as the raventoxins, derived from the spider *Macrothele raveni* (Zeng et al., 2003), lophotoxin from the sea whip *Lophogorgia rigida* (Culver and Jacobs, 1981) and borbotoxins from *Procentrum borbonicum* (Ten-Hage et al., 2002).

The high toxicity of pinnatoxin F by voluntary consumption raises concerns as to the possibility of human intoxication by this substance; 16 µg/kg would equate to a dose of only 960 µg for a 60 kg adult. The highest level of pinnatoxin F so far recorded in New Zealand oysters is 160 µg/kg (Andrew Selwood, unpublished observation). The European Food Safety Authority Panel on Contaminants in the Food Chain (2010) recommended that a consumption figure of 400 g should be used for estimating human exposure to shellfish toxins. At a level of 160 µg/kg, consumption of 400 g of oysters would provide a dose of 64 µg of pinnatoxin F. In France, pinnatoxins have generally been found to be absent from shellfish or present at very low concentrations. In one location (a Mediterranean lagoon), however, levels have exceeded 800 µg/kg in mussels, although the main analogue identified was the less toxic pinnatoxin G (Philipp Hess, personal communication). Clearly, pinnatoxin levels in seafood need to be carefully monitored, but it should be noted that no adverse effects have been observed in humans consuming seafood known to be contaminated by pinnatoxins (McNabb et al., 2012).

It has sometimes been stated in the literature that pinnatoxin A has been linked to shellfish poisoning events in Japan and China, citing the paper by Uemura et al. (1995), but this assertion is misleading. Episodes of gastroenteritis in Japan in 1975 and 1980, associated with consumption of *Pinna pectinata*, were mentioned in the cited paper, but the effects were later attributed to contamination of the shellfish by *Vibrio* species (Otofuji et al., 1981). Effects in humans associated with consumption of *P. attenuata* in China in 1980 and 1989 were not linked to the presence of pinnatoxins, and the shellfish from which the uncharacterised “pinnatoxin” (Zheng et al., 1990) was isolated were gathered in 1982 and 1983, when no cases of poisoning were reported (McNabb et al., 2012). Furthermore, no adverse effects in humans have been recorded with any of the other cyclic imines (Munday, 2008), even though many such compounds are highly toxic to mice. Studies on the possible resistance of humans to the harmful effects of cyclic imines, possibly attributable to differences in absorption or detoxification processes, are required.

Acknowledgements

Thanks to Susie Wood (Cawthron Institute, Nelson) for identifying the cyanobacterial mat from Northland, and to Dr. C. O. Miles (National Veterinary Institute, Oslo) for assistance with NMR data acquisition. This work was funded by the New Zealand Foundation for Research, Science and Technology, Contract CAWX0703.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

- Bourne, Y., Radić, Z., Araújo, R., Talley, T.T., Benoit, E., Servent, D., Taylor, P., Molgó, J., Marchot, P., 2010. Structural determinants in phycotoxins and AChBP conferring high affinity binding and nicotinic AChR antagonism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 107, 6076–6081.

- Chou, T., Haino, T., Kuramoto, M., Uemura, D., 1996. Isolation and structure of pinnatoxin D, a new shellfish poison from the Okinawan bivalve *Pinna muricata*. *Tetrahedron Lett.* 37, 4027–4030.
- Codex, 2006. Codex Committee on Fish and Fishery Products. Twenty-eighth Session, Beijing, China, 18–22 September 2006. [ftp://ftp.fao.org/Codex/ccffp28/fp2806ae.pdf](http://ftp.fao.org/Codex/ccffp28/fp2806ae.pdf).
- Culver, P., Jacobs, R.S., 1981. Lophotoxin: a neuromuscular acting toxin from the sea whip (*Lophogorgia rigida*). *Toxicol* 19, 825–830.
- European Food Safety Authority Panel on Contaminants in the Food Chain, 2010. Statement on further elaboration of the consumption figure of 400 g shellfish meat on the basis of new consumption data. *EFSA J.* 8 (1706), 1–20.
- Gad, S.C., 1994. Routes in toxicology: an overview. *J. Am. Coll. Toxicol.* 13, 34–39.
- Hauser, T.A., Hepler, C.D., Kombo, D.C., Grinevich, V.P., Kiser, M.N., Hooker, D.N., Zhang, J., Mountfort, D., Selwood, A., Akireddy, S.R., Letchworth, S.R., Yohannes, D., 2012. Comparison of acetylcholine receptor interactions of the marine toxins, 13-desmethylspirolide C and gymnodimine. *Neuropharmacology* 62, 2239–2250.
- Hellyer, S.D., Selwood, A.I., Rhodes, L., Kerr, D.S., 2011. Marine algal pinnatoxins E and F cause neuromuscular block in an *in vitro* hemidiaphragm preparation. *Toxicol* 58, 693–699.
- Keller, M.D., Selvin, R.C., Claus, W., Guillard, R.R.L., 1987. Media for the culture of oceanic ultraphytoplankton. *J. Phycol.* 23, 633–638.
- Kharrat, R., Servent, D., Girard, E., Ouanounou, G., Amar, M., Marrouchi, R., Benoit, E., Molgó, J., 2008. The marine phycotoxin gymnodimine targets muscular and neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes with high affinity. *J. Neurochem.* 107, 952–963.
- McCarron, P., Rourke, W.A., Hardstaff, W., Pooley, B., Quilliam, M.A., 2012. Identification of pinnatoxins and discovery of their fatty acid ester metabolites in mussels (*Mytilus edulis*) from eastern Canada. *J. Agric. Food Chem.* 60, 1437–1446.
- McCauley, J.A., Nagasawa, K., Lander, P.A., Mischke, S.G., Semones, M.A., Kishi, Y., 1998. Total synthesis of pinnatoxin A. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 7647–7648.
- McNabb, P.S., McCoubrey, D.J., Rhodes, L., Smith, K., Selwood, A.I., van Ginkel, R., MacKenzie, A.L., Munday, R., Holland, P.T., 2012. New perspectives on biotoxin detection in Rangaunu Harbour, New Zealand, arising from the discovery of pinnatoxins. *Harmful Algae* 13, 34–39.
- Munday, R., Towers, N.R., Mackenzie, L., Beuzenberg, V., Holland, P.T., Miles, C.O., 2004. Acute toxicity of gymnodimine to mice. *Toxicol* 44, 173–178.
- Munday, R., 2006. Toxicological requirements for risk assessment of shellfish contaminants: a review. *Afr. J. Marine. Sci.* 28, 447–449.
- Munday, R., 2008. Toxicology of cyclic imines: gymnodimine, spirolides, pinnatoxins, pteriatoxins, proro-centrolide, spiro-prorocentrimine, and symbioimines. In: Botana, L.M. (Ed.), *Seafood and Freshwater Toxins, Pharmacology Physiology and Detection*, second ed. CRC Press, Boca Raton, pp. 581–594.
- Munday, R., Quilliam, M.A., LeBlanc, P., Lewis, N., Gallant, P., Sperker, S.A., Ewart, H.S., MacKinnon, S.L., 2012. Investigations into the toxicology of spirolides, a group of marine phycotoxins. *Toxins* 4, 1–14.
- Nézen, E., Chomérat, N., 2011. *Vulcanodinium rugosum* gen. et sp. nov. (Dinophyceae), un nouveau dinoflagellé de la côte méditerranéenne française. *Cryptogamie Algologie* 32, 3–18.
- OECD, 2008. OECD Guidelines for Testing of Chemicals. 425. Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure (UDP). Adopted: 3 October 2008. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. <http://browse.oecdbookshop.org/oecd/pdfs/free/9742501e.pdf>.
- Otofujii, T., Ogo, A., Koishi, J., Matsuo, K., Tokiwa, H., Yasumoto, T., Nishihara, K., Yamamoto, E., Saisho, M., Kurihara, Y., Hayashida, K., 1981. Food poisoning caused by *Atrina pectinata* in the Ariake Sea. *Food Sanit. Res.* 31, 76–83.
- Rhodes, L., Smith, K., Selwood, A., McNabb, P., van Ginkel, R., Holland, P., Munday, R., 2010. Production of pinnatoxins by a peridinoid dinoflagellate isolated from Northland, New Zealand. *Harmful Algae* 9, 384–389.
- Rhodes, L., Smith, K., Selwood, A., McNabb, P., Munday, R., Suda, S., Molenaar, S., Hallegraef, G., 2011a. Dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum* identified as the causative organism of pinnatoxins in Australia, New Zealand and Japan. *Phycologia* 50, 624–628.
- Rhodes, L., Smith, K., Selwood, A., McNabb, P., Molenaar, S., Munday, R., Wilkinson, C., Hallegraef, G., 2011b. Production of pinnatoxins E, F and G by scrippsielloid dinoflagellates isolated from Franklin Harbour, South Australia. *N. Z. J. Marine Freshw. Res.* 45, 703–709.
- Rundberget, T., Aasen, J.A.B., Selwood, A.I., Miles, C.O., 2011. Pinnatoxins and spirolides in Norwegian blue mussels and seawater. *Toxicol* 58, 700–711.
- Selwood, A.I., Miles, C.O., Wilkins, A.L., van Ginkel, R., Munday, R., Rise, F., McNabb, P., 2010. Isolation, structural determination and acute toxicity of pinnatoxins E, F and G. *J. Agric. Food Chem.* 58, 6532–6542.
- Takada, N., Umemura, N., Suenaga, K., Chou, T., Nagatsu, A., Haino, T., Yamada, K., Uemura, D., 2001. Pinnatoxins B and C, the most toxic components in the pinnatoxin series from the Okinawan bivalve *Pinna muricata*. *Tetrahedron Lett.* 42, 3491–3494.
- Ten-Hage, L., Robillot, C., Turquet, J., Le Gall, F., Le Caer, J.-P., Bultel, V., Guyot, M., Molgó, J., 2002. Effects of toxic extracts and purified borbotoxins from *Prorocentrum borbonicum* (Dinophyceae) on vertebrate neuromuscular junctions. *Toxicol* 40, 137–148.
- Uemura, D., Chou, T., Haino, T., Nagatsu, A., Fukuzawa, S., Zheng, S.-Z., Chen, H.-S., 1995. Pinnatoxin A: a toxic amphoteric macrocycle from the Okinawan bivalve *Pinna muricata*. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 1155–1156.
- USEPA, 2002. User Documentation for the AOT425StatPgm Program. Prepared for the US Environmental Protection Agency by Westat, May 2001; updated by USEPA Sept. 2002. <http://www.oecd.org/dataoecd/19/57/1839830.pdf>.
- Zheng, S.Z., Huang, F.L., Chen, S.C., Tan, X.F., Peng, J., Xie, R.W., 1990. The isolation and bioactivities of pinnatoxin. *Chin. J. Marine Drugs* 9, 33–35.
- Zeng, X.-Z., Xiao, Q.-B., Liang, S.-P., 2003. Purification and characterization of raventoxin-I and raventoxin-III, two neurotoxic peptides from the venom of the spider *Macrothele raveni*. *Toxicol* 41, 651–656.

Annexe 6 : Avis de Prof. Aurelia Tubaro pour les études in vivo



Trieste, 14th September 2012

To Dr.
Philipp Hess
IFREMER
Nantes

Dear Dr. Hess

Your initial request for collaboration on the topic of the toxicity of Pinnatoxin G suggested that you were interested in our expertise to conduct experiments to elucidate the oral toxicity of Pinnatoxin G. You furthermore suggested that an oral gavage of rats should be conducted and that diarrhea should be used as an endpoint in determining if any toxic effect could be discerned.

It is our opinion that this suggestion is not valid for two main reasons:

- a) The rat model would consume much pure toxin and hence your study could only possibly be based on algal extracts.
- b) Diarrhea is not an appropriate endpoint *a priori*.

The first point depends on toxin availability which appears very limited at the moment for Pinnatoxin G. The second point is more systematic and from toxicology point of view we insist that diarrhea is only one of many possible endpoints in acute toxicity. Hence, we would rather suggest a study using oral gavage but leaving open the endpoints. Both clinical, hematoclinical and histopathological examinations should be carried out in exposed animal populations and a follow-up study could then aim at the determination of a NOAEL.

As you are aware, a recent study by Munday et al., 2012, has examined several effects of Pinnatoxin G on mice orally exposed to the toxin. We have read this study with interest and would like to make the following comments on the study:

Critical reflection on the study by Munday et al., 2012:

- 1) The purity of the toxin is not declared: so we don't know if other compounds (i.e. heavy metals, cyanotoxines etc.) can be present and interfere with the obtained results.
- 2) The mice used for these toxicity experiments seem to be produced "in house" (are they inbred or outbred?), possibly without any health control (bacteria or virus, for instance). Moreover no data relating the number of animals used and the animal house conditions are reported.

Since it is well known that any stress conditions can interfere with the obtained results, it is important to know how the animals were maintained (light/dark cycle is very important, for instance, to avoid hormonal interferences that can impair the results, etc., etc.).



- 3) The solvent used to dissolve the substances (ethanol) seems to be given at very high final concentrations (5 % after i.p. administration) and 12.5 % (!!!) after *per os* administration. Moreover 1 % Tween 60 was used to dilute the ethanol-dissolved pinnatoxins: all these substances can interfere with the absorption of the toxins. Even though the control mice received the same vehicle, this does not exclude that the vehicle can interfere with the toxin absorption.
- 4) Usually, in toxicological studies, the substances are administered in 10 mL/kg body weight of animals. In case of i.p. administration, 1 mL of the toxin dissolved in ethanol and diluted in 1% Tween 60, was administered to mice of 18-22 g, causing them a further stress.

Anyway, since the amount and the composition of the vehicle used is not the same after i.p. and p.o. administration, a comparison between the results obtained by the two routes of administration is not possible. Furthermore, the authors do not report all the doses used, in terms of mg/kg body weight of animals.

- 5) Fasting periods of 16 hours are a relatively long time that could cause additional stress to the animals, moreover the choice of giving the food back to the animals immediately after the administration is quite strange and should be motivated. According to OECD guidelines (425) animals should be fasted for 3-4 hours before dosing and left without food for a further 1-2 hours after the treatment.
- 6) Administration of toxins with the cream cheese and butter does not seem to alter the LD₅₀ values, but in spite of that, it is really possible to mimic with this approach the interaction with the food? The choice of food so different in composition from the suspected vehicle of the intoxication should be motivated; otherwise the “voluntary” administration can be obtained in other ways. The use of cream cheese or butter can also alter the pharmacokinetics of the toxin.
- 7) Similarly, how much toxin was contained in the pellets: how was the amount of toxins in the pellets checked and how was the toxin-charged pellet prepared?
- 8) It is not possible to define a NOAEL from this kind of experiments in our opinion. If the end point is the lethality of mice, an actual NOAEL is not detectable. Anyway, since neither hemato-clinical nor histo-pathological analysis were not carried out (which of course in one animal would not be significant!), the authors cannot define a NOAEL that can be used for the toxicological risk assessment. Consequently, no relevant Acute Reference Dose can be defined.

From all these observations and because of the mechanism of action of pinnatoxins, it is clear that toxicological experiments on pinnatoxins need to be repeated. In particular, we would like to propose a study that:

- 1) Provides data on the actual purity of the toxin and that uses standard toxicological conditions;
- 2) Checks the acute toxicity of pinnatoxin-G by gavage in fasted mice (3-5 mice per dose) to check the actual toxicity of the compound, carrying out the most important hemato-clinical analysis (also on the basis of their mechanism of action) as well as histological observations, to determine an actual NOAEL.
- 3) Checking the reversibility of the observed effects, leaving some animals to survive for 14 days after the treatment (recovery).



- 4) It would be most appropriate to carry out an initial study to verify relevant dose levels of acute toxicity (without the use of high percentages of ethanol as vehicle!) and, subsequently, to carry out a repeated daily treatment (at least for 7 days) with 2-3 low doses of pinnatoxins on 3-5 mice, to obtain more significant toxicological information, through the evaluation of the same parameters reported before. The NOAEL obtained in this way is much more significant for the toxicological risk characterization and can give the actual basis for the ARfD determination, necessary for regulatory purposes.

We trust that you would reconsider your request in a way that would be appropriate in our opinion. We are open to discuss any details of the study with you or other toxicologists that may collaborate on this topic.

With our best regards,

Prof. Aurelia Tubaro

Italian Certified Toxicologist of RENTIC

Prof. Silvio Sosa

Annexe 7 : Isolement de composés bioactifs dans *V. rugosum* (COLNACOQ)

Les observations mentionnées en section 7.1 nous ont amené à étudier l'extrait brut de *V. rugosum* de manière plus approfondie. Plus particulièrement nous avons suivi la purification décrite par Selwood et al., 2010, pour isoler la PnTX-G (Schéma 1). Une première purification a été conduite en partitionnant l'extrait brut entre dichlorure de méthane (DCM) et eau afin d'éliminer le sel de l'extrait, la pinnatoxine est quantitativement transférée dans la phase organique. Ensuite, une partition entre hexane et méthanol aqueux a été pratiquée pour éliminer les cires de l'extrait purifié, la pinnatoxine est retenue dans la phase du méthanol aqueux. Une troisième étape de purification a été effectuée : séparation de l'extrait sur colonne silice. Cette séparation a résulté en cinq fractions dont la troisième contient la PnTX-G. Ces trois étapes de purification sont considérées efficaces car elles augmentent la concentration en PnTX-G d'un facteur 40 avec un rendement d'environ 75% (moyenne de 92% de rendement par étape).

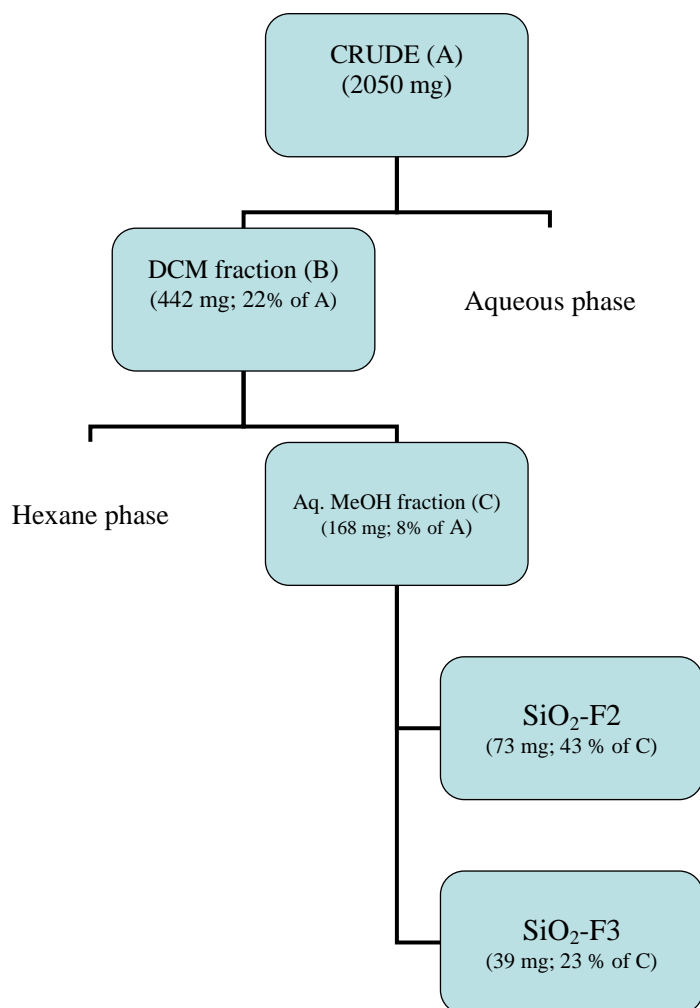
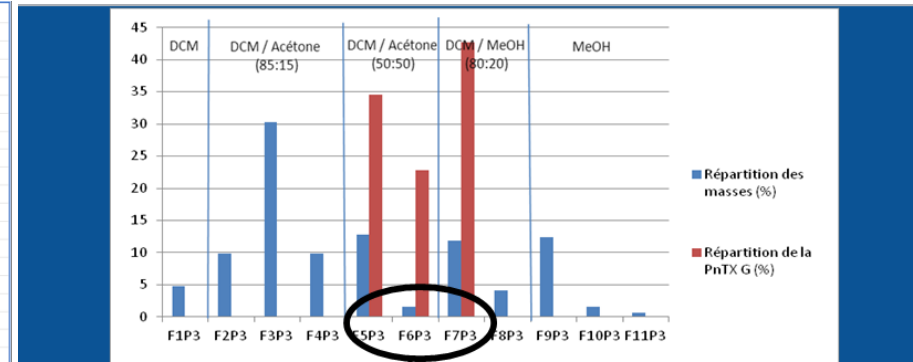
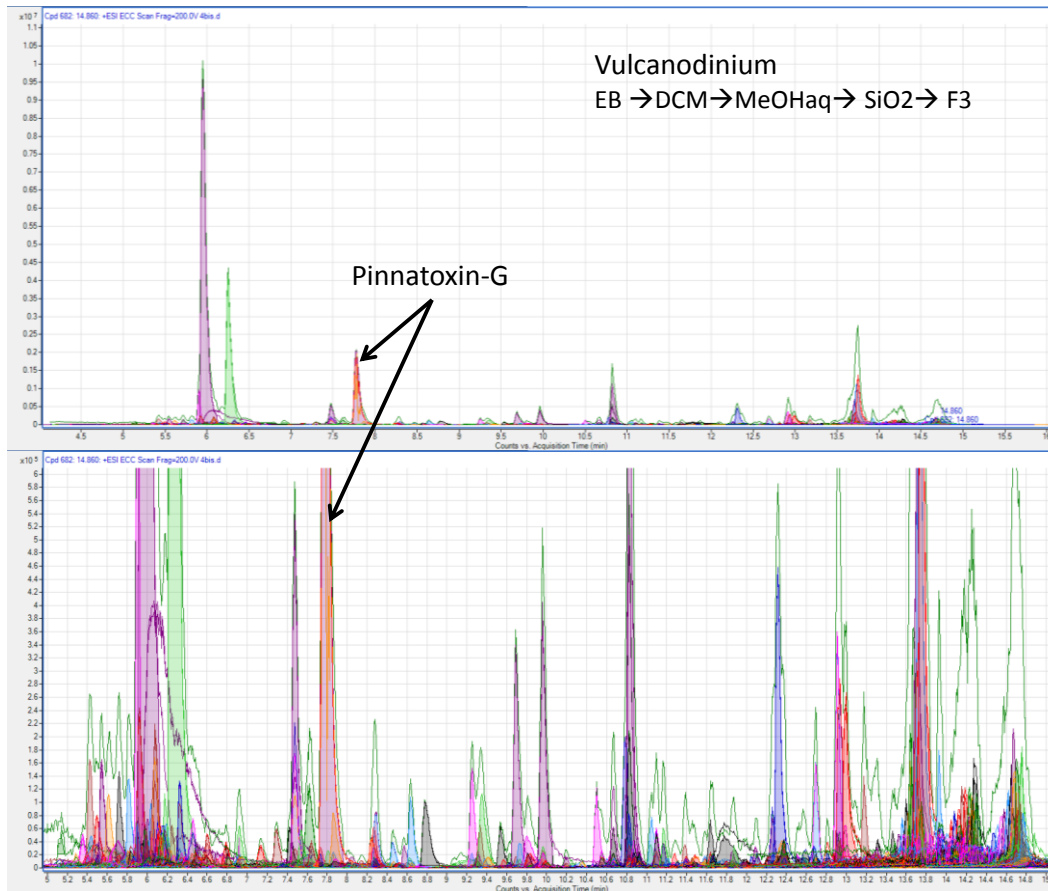


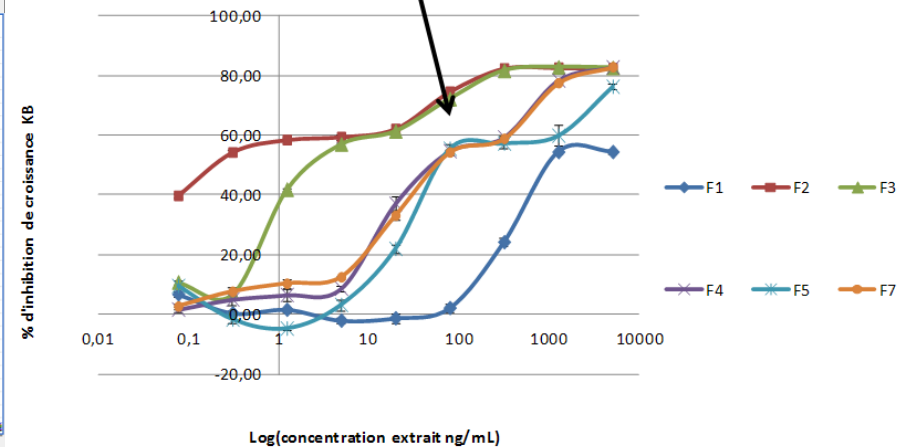
Schéma 1. Purification partielle de l'extrait brut de *V. rugosum* par trois étapes de purification (2 partitions de phase et une séparation sur silice)

Le biosuivi du fractionnement par essai de cytotoxicité confirme également que la toxicité de l'extrait brut est contenue successivement dans le dichlorure de méthane et le méthanol aqueux. Les fractions de silice montrent toutes les cinq une cytotoxicité sur modèle KB. Les deux fractions les plus toxiques (F2 et F3) sont par la suite analysées par spectrométrie de masse haute résolution (Agilent Q-ToF 6540).

L'analyse CL-SM en mode full scan montre que la fraction F3 contient bien la PnTX-G (Figure ci-dessous).

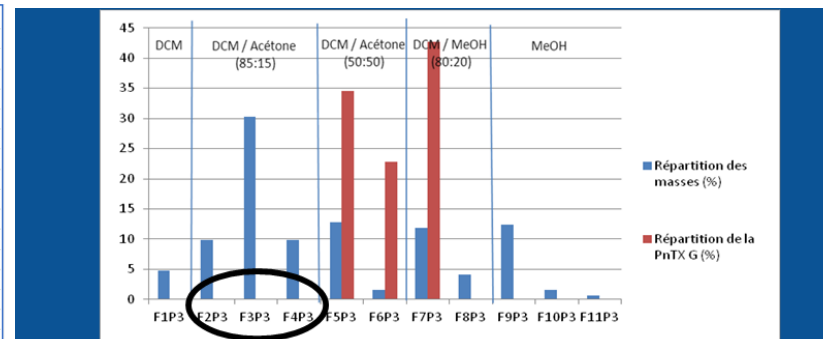
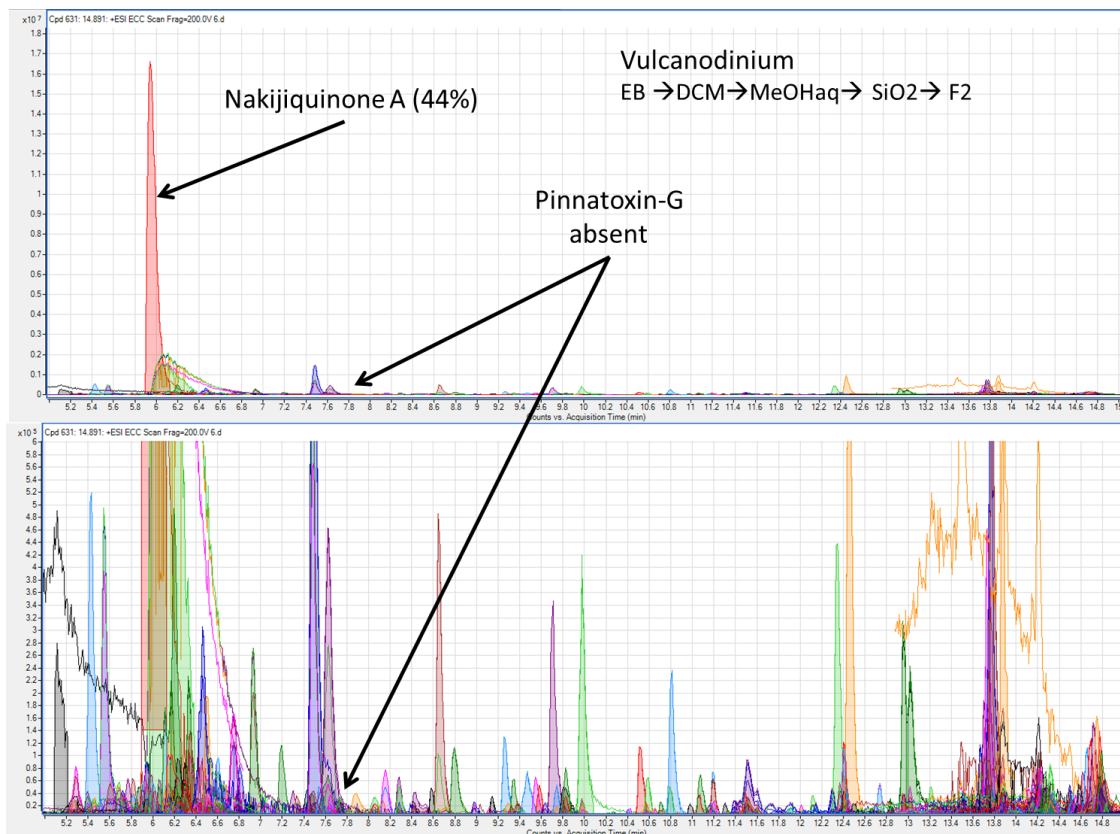


Cytotoxicité de différentes fraction de *V. rugosum* - T72h

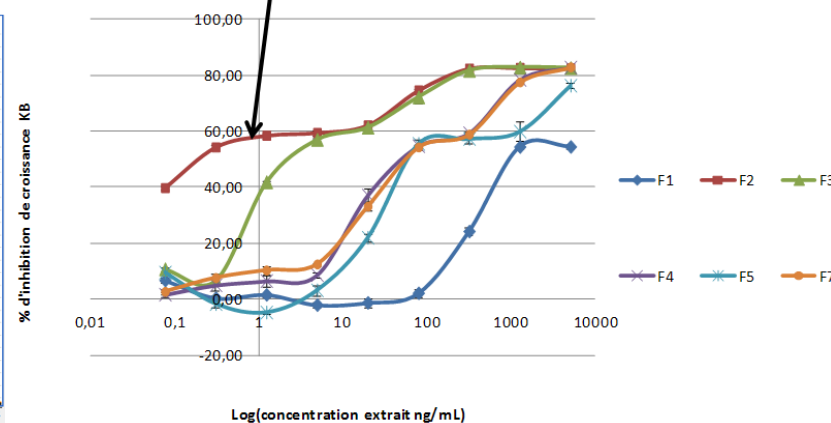


Après élimination par traitement électronique des données brutes, nous avons pu identifier 1164 entités chimiques présentes dans les deux fractions F2 et F3. En examinant ces résultats pour ne retenir que les entités les plus probables, cette procédure a donnée 144 composés, dont 78 dans la fraction F2 et 66 composés dans la fraction F3.

La fraction F2 était la plus toxique malgré qu'elle ne contient pas de PnTX-G (Figure ci-dessous)



Cytotoxicité de différentes fraction de *V. rugosum* - T72h



Grâce à une récente collaboration avec Agilent nous avons pu bénéficier de la disponibilité d'une base de donnée (AntiMarine, Hartmut Laatsch, John Blunt & Murray Munro). En comparant nos résultats contre les composés listés dans cette base de données, nous avons pu identifier de manière préliminaire certains des composés potentiellement responsables des effets cytotoxiques observés. Parmi les 144 composés les plus probables dans notre échantillons, il y avait 45 composés listés dans la base de donnée à une précision de 5 ppm, ou 22 composés à une précision de < 1 ppm.

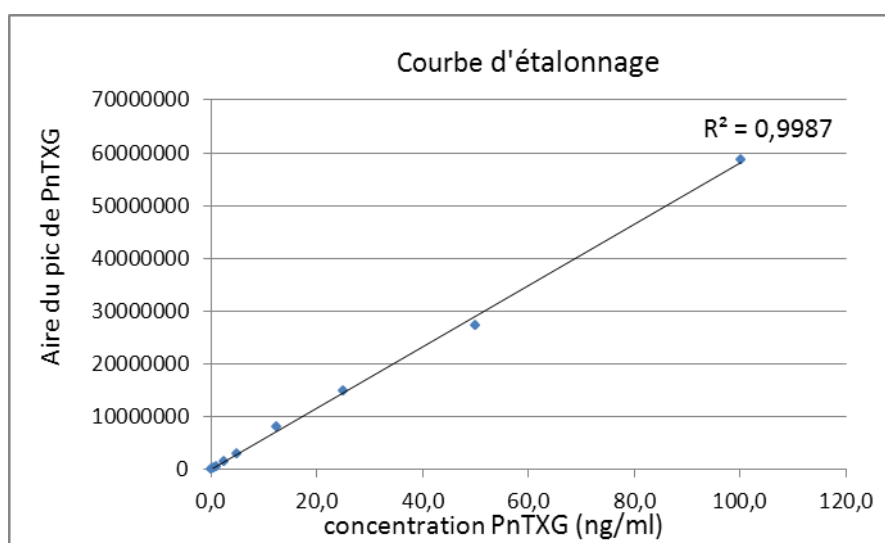
Les tableaux ci-dessous listent ces composés avec quelques détails supplémentaires.

Composés possiblement présents dans la fraction 2	Diff (DB, ppm)	Score (DB)	Hauteur	Ions	Masse	TR [min]	Vol %
1,2-Benzenedicarboxylic acid; Bis(2-methylpropyl) ester	-1,14	99,21	42225	4	278,1521	12,991	0,14
12-Bromo-5(13),6,9- lauratriene; 8,11-Didehydro	2,42	96,48	30019	3	278,0863	9,333	0,12
17,18-Epoxy-1(19),7,10,12- xenicatetraene-6,14,17-triol; (6ct, 7Z ,10Z ,12E ,17ct)-form, 17-Me ether	-1,24	98,82	29155	4	348,2305	11,642	0,12
2-Amino-4-hexadecene-1,3- diol; (2R ,3S ,4E)-form	-0,56	99,81	193609	4	271,2513	9,693	0,78
2-Amino-4-octadecene-1,3- diol; (2RS ,3RS ,4E)-form	0,33	99,93	44380	3	299,2823	11,054	0,17
2-Amino-5-octadecene-1,3,4- triol; (2?,3?,4?,5E)-form	-1,2	99	323787	5	315,2777	12,316	1,08
2-Amino-6-octadecene-1,3,4- triol; (2S ,3S ,4R ,6E)-form, 4- O -Sulfate	1,98	96,61	117331	3	395,2334	5,549	0,41
5,12-Dihydrocycloocta[1,2-b :5,6-b '']diindole-6,13- dicarboxylic acid	4,53	84,43	36876	3	370,0937	14,675	0,1
8-Hydroxy-5,9,11,14- eicosatetraenoic acid; (5Z ,8S ,9E ,11Z ,14Z)-form, Me ester	-1,2	98,93	78008	3	334,2512	13,753	0,23
Bonellin , Green pigment from the female gephyrean worm <i>Bonellia viridis</i> , larvicide	3,24	88,78	58041	3	526,2563	10,831	0,15
Clathrynamide A; (4E ,6E)- Isomer, debromo , From marine sponges <i>Clathria</i> sp. and <i>Psammoclema</i> sp.	-0,42	99,85	132173	3	383,2462	6,08	0,51
Fischerellin B , Cyanobacteria: <i>F. muscicola</i> et <i>F. ambigua</i> (Papke, 1997)	-3,08	93,92	772008	3	299,2258	5,905	1,75
Glycerol 1-alkanoates; Glycerol 1- hexadecanoate, 3-O -?-D- Galactopyranoside	0,32	99,89	164264	7	492,3297	12,911	0,72
Glycerol 1-alkanoates; Glycerol 1- hexadecanoate, 3-O -?-D- Galactopyranoside	0,84	99,25	72482	5	492,3294	12,695	0,31
Glycerol 1-alkyl ethers; Glycerol 1-(2R -methoxyhexadecyl) ether	1,54	98,17	32278	4	346,3078	14,775	0,2
Nakijiquinone A Okinawan marine sponge, red solid, protein tyrosine kinase inhibitor, synth 2001	-3,36	90,39	6942584	6	401,2216	5,955	28,41
Petrosaspongiolide L , Cytotoxic alkaloid from sponge <i>Petrosaspongia nigra</i>	-2,46	95,15	3228350	4	369,2677	6,253	11,74
Piericidin; Piericidin A1, 5- Demethoxy , Pyridin antibiotic family, marine dreived <i>Streptomyces</i> sp.	-1,01	99,13	186301	3	385,2621	5,925	0,64
Plakinic acid F; 5-Epimer , Antifungal agent from caribbean sponge, synthesized 2006	-1,84	97,18	71903	3	378,2777	13,734	0,22
Roquefortine; N 16-Et , Neurotoxin-derivative from <i>Penicillium janczewskii</i>	3,38	89,97	58344	5	417,2151	7,621	0,42
Sarcotin G , from sponge <i>Sarcotragus</i> sp.	0,25	99,94	98184	3	456,2147	6,329	0,3

Composés possiblement présents dans la fraction 3	Diff (DB, ppm)	Score (DB)	Hauteur	Ions	Masse	TR [min]	Vol %
12-Bromo-5(13),6,9- lauratriene; 8,11-Didehydro , from red alga <i>Laurentia pinnatifida</i> (1984)	2,54	96,13	31437	3	278,0863	9,35	0,09
2-Amino-4-hexadecene-1,3- diol; (2R ,3S ,4E)-form	-1,18	99,18	201726	4	271,2514	9,71	0,62
2-Amino-4-octadecene-1,3- diol; (2RS ,3RS ,4E)-form	0,79	99,59	42161	3	299,2822	11,08	0,12
2-Amino-5-octadecene-1,3,4- triol; (2?,3?,4?,5E)-form	-1,3	98,82	311433	5	315,2778	12,35	0,75
2-Amino-6-heptadecene-1,3,4- triol; (2S ,3S ,4R ,6E)-form, 4- Sulfate	0,52	99,77	403768	3	381,2183	5,43	0,93
2-Amino-6-octadecene-1,3,4- triol; (2S ,3S ,4R ,6E)-form, 4- O -Sulfate	2,15	96,02	18295	3	395,2333	5,45	0,05
3,4-Dihydroxy-19-norpregna-1,3, 5(10),20-tetraen-6-one; 3-O -[4- Acetyl-6-deoxy-3-Laltropyranoside]	-0,41	99,82	198562	3	500,2412	6,93	0,48
4,7-Epoxy-2-hydroxy-12-oxo-5, 8(17),13-briaratrien-18,7-olide; Ac	-0,5	99,79	49577	3	386,1731	9,83	0,11
9,13-Epidioxy-11-hydroxy-15-nor- 14-oxo-11-isocopalene-16-oic acid	0,26	99,95	50202	3	350,1728	8,16	0,14
Bryostatine 14 , cytotoxic macrolide, antibiotic, from the marine bryozoan <i>Bugula neritina</i>	-1,6	96,09	29261	4	824,4208	5,95	0,07
Glycerol 1-alkyl ethers; Glycerol 1-(2R -methoxyhexadecyl) ether	0,28	99,94	21536	3	346,3082	14,82	0,12
Lydicamycin; 8-Deoxy , gram-positive antibiotic from marine-derived <i>Streptomyces lydicus</i>	-1,79	95,08	30165	3	838,5471	14,21	0,07
Micropeptin 88E , depsipeptide antibiotic from <i>Microcystis aeruginosa</i>	-3,52	80,13	27956	3	1062,568	14,50	0,06
Nakijiquinone A , Okinawan marine sponge (1994), red solid, protein tyrosine kinase inhibitor	-3,46	89,84	10233733	7	401,2216	5,95	44,36
Nakijiquinone D	0,74	99,46	27344	3	445,2461	8,29	0,07
Nakijiquinone D; 25- Demethyl	1,26	98,5	50930	4	431,2302	6,24	0,18
Neobonellin , embryotoxic pigment of the skin of <i>Bonellia viridis</i>	4,04	80,7	21853	4	639,3395	10,80	0,06
Perinadine A , from a marine-derived <i>Penicillium citrinum</i> strain	-0,16	99,97	99004	3	499,2571	6,35	0,29
Plakinic acid F; 5-Epimer , antifungal agent from Caribbean sponge, synthesized 2006	-2,14	96,22	37012	3	378,2778	13,77	0,08
Roquefortine; N 16-Et , neurotoxin-derivative from <i>Penicillium janczewskii</i>	0,06	100	1210149	4	417,2164	6,10	10,34
Roridin H , antileukaemic agent from <i>Myrothecium verucaria</i>	0,41	99,82	47235	3	512,2408	6,51	0,14
Sarcotrin G , from sponge <i>Sarcotragus</i> sp.	-0,21	99,96	133693	3	456,2149	6,11	0,18
Sarcotrine A; N -Dealkyl, N - (carboxymethyl) , from sponge <i>Sarcotragus</i> sp.	-0,53	99,71	142521	3	471,2623	6,50	0,35
Trichodimerol; 8,9-Dihydro , from marine-derived <i>Penicillium terrestre</i>	0,49	99,74	34805	3	498,2251	6,16	0,12

Annexe 8 : Méthode analytique utilisée pour l'analyse CL-SM/SM**Gamme étalon pinnatoxine G dans méthanol, préparée le 28 juin 2011**

point de gamme	concentration (ng/ml)
C1 PnTXG 28062011	0,50076
C2 PnTXG 28062011	1,00152
C3 PnTXG 28062011	2,5038
C4 PnTXG 28062011	5,0076
C5 PnTXG 28062011	12,519
C6 PnTXG 28062011	25,038
C7 PnTXG 28062011	50,076
C8 PnTXG 28062011	100,152

**Analyse physico-chimique des pinnatoxines par CL-SM/SM****(Identique à l'analyse des spirolides (méthode lipophiles - mode positif))**

Paramètres chromatographiques (CL)

Pré-colonne et colonne remplies avec une phase chromatographique C8, 3µm, de type Hyperclone MOS, 50x2.0mm + pré-colonne 10x2,0 mm (référence Phenomenex).

Eluant A : eau MilliQ + 2 mM formiate d'ammonium + 50 mM acide formique

Eluant B : Acétonitrile/eau MilliQ (95/5) + 2 mM formiate d'ammonium + 50 mM acide formique.

Débit : 200 µL/min

Température four de colonne : 25°C

Volume injecté : 5 µL

Gradient d'élution :

Temps (min)	Eluant A (%)	Eluant B (%)
0	70	30
2,5	5	95
7.5	5	95
7.6	70	30
10	70	30

Paramètres du spectromètre de masse (SM)

Les paramètres suivants sont applicables pour l'appareil 5500QTrap (AB Sciex)

- Source electrospray

- Mode scan : MRM – mode positif

- Paramètres de la source du SM :

Curtain Gas : 20 psi

CAD : Medium

Ion Spray : 5500 V

Temperature: 650°C

GS1: 50 psi

GS2: 60 psi

Ihe: ON

EP : 10 V

- Paramètres Compound (optimisés sur le standard PnTX G fourni par le CNRC)

Toxine	Q1 Mass	Q3 Mass	Dwell [msec]	DP [V]	CE [eV]	CXP [V]
PnTX G	694.4	676.4	35	30	53	10
	694.4	458.3			59	6
	694.4	440.2			63	6
	694.4	164.1			67	10
PnTX A	712.4	694.4			53	10
	712.4	458.3			59	6
	712.4	164.1			67	10
	712.4	440.2			63	6
PnTX B,C	741.4	723.5			53	10
	741.4	458.3			59	6
	741.4	164.1			67	10
	741.4	440.2			53	6
PnTX D	782.4	764.4			53	10
	782.4	488.3			59	6
	782.4	164.1			67	10
	782.4	470.2			63	6
PnTX E	784,4	738,4			53	10
	784,4	488,3			59	6
	784,4	164,1			67	10
	784,4	470,2			63	6
PnTX F	766,4	738,4			53	10
	766,4	488,3			59	6
	766,4	164,1			67	10
	766,4	470,2			63	6
Pteria_ABC	831,5	787,5			53	10
	831,5	458,3			59	6
	831,5	164,1			67	10

Pour l'ensemble des pinnatoxines, la quantification est effectuée sur la transition donnant l'ion fils 164

