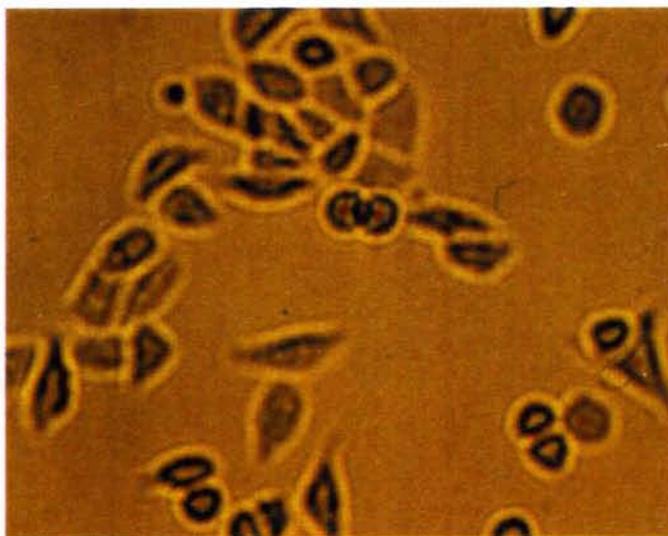


RST.DEL/01.01/PN

## Etude de pré-validation du test de cytodétection des toxines diarrhéiques (acide okadaïque) dans les coquillages contaminés

D. Le Gal <sup>(1)</sup>, C. Marcaillou - Le Baut <sup>(2)</sup>, M. Fortune <sup>(3)</sup>, M. Bohec <sup>(2)</sup>,  
F. Mondeguer <sup>(2)</sup>, D. Morel <sup>(4)</sup>, Y.F. Pouchus <sup>(4)</sup>



*cellule KB en culture*

<sup>(1)</sup> Ifremer, laboratoire côtier DEL/CC, <sup>(2)</sup> Ifremer, laboratoire DEL/PN Nantes,  
<sup>(3)</sup> Ifremer, laboratoire côtier DEL/NT, <sup>(4)</sup> SMAB, Faculté de Pharmacie, Nantes

## Fiche documentaire

<b>Numéro d'identification du rapport :</b> RST.DEL/01.01/PN <b>Diffusion :</b> libre : <input checked="" type="checkbox"/> restreinte : <input type="checkbox"/> interdite : <input type="checkbox"/> <b>Validé par :</b> Patrick Lassus  Adresse électronique : - chemin UNIX :  - adresse WWW :	<b>date de publication :</b> Octobre 2001  <b>nombre de pages :</b> 18  <b>bibliographie :</b> Oui  <b>illustration(s) :</b> Oui  <b>langue du rapport :</b> Français
<b>Etude de pré-validation du test de cytodétection des toxines diarrhéiques (acide okadaïque) dans les coquillages contaminés</b>  <i>Prevalidation study of the cytodetection test for diarrhoeic toxins (okadaic acid) in contaminated shellfish</i>	
Contrat n° _____ Rapport intermédiaire <input type="checkbox"/> N° _____ Rapport définitif <input type="checkbox"/>	
<b>Auteur(s) principal(aux) :</b> Dominique Le Gal, Claire Marcaillou - Le Baut	<b>Organisme / Direction / Service, laboratoire</b> IFREMER Direction de l'Environnement et de L'Aménagement Littoral
<b>Collaborateur(s) :</b> M. Fortune, M. Bohec, F. Mondeguer, D. Morel, Y.F. Pouchus  <b>Coordination - secrétariat :</b> M. Vrignaud	Organisme / Direction / Service, laboratoire
<b>Cadre de la recherche :</b> Programme : _____ Convention : _____ Projet : _____ Autres (préciser) : _____ Campagne océanographique : (nom de campagne, année, nom du navire)	
<b>Résumé :</b> Un test de cytodétection des toxines diarrhéiques a été mis au point conjointement par l'Ifremer et l'Université de Nantes. Son principe est basé sur la modification morphologique du contour cellulaire (lignée KB) induite par l'inhibition des protéines phosphatases impliquées dans l'édification du cytosquelette. Ce test s'est montré sensible, rapide et spécifique des toxines actives sur ces enzymes dont font partie les toxines diarrhéiques (essentiellement l'acide okadaïque en France). La lignée cellulaire présente une très haute stabilité démontrée par les bonnes répétabilité et reproductibilité du test sur la toxine pure (concentration minimale active ou CMA = 125ng d'AO.ml <sup>-1</sup> ). Afin de juger de la pertinence de transférer la méthode aux laboratoires côtiers, l'essai a été soumis à une étude de prévalidation. L'échantillonnage, réalisé et contrôlé par le test-souris dans le cadre du REPHY pendant deux années consécutives, est constitué de cinq espèces de coquillage. Après extraction, chaque échantillon a été partagé entre quatre laboratoires, qui les ont analysés par le test KB d'une manière indépendante et en aveugle. Les extraits ont aussi été analysés en CLHP. Les résultats montrent 50 % d'homogénéité entre les opérateurs, toute espèce de coquillage confondue, ce qui est faible et résulte de la difficulté à apprécier la modification du contour cellulaire correspondant à la CMA. La comparaison des résultats entre le test KB et le test-souris, sur la base des décisions des fermetures des zones de production, montre que le test KB est plus sévère mais qu'il ne présente pas de faux négatif, ce qui va dans le sens des recommandations européennes. Pour certaines espèces (amandes, coques) on observe un effet sur les cellules KB alors que les extraits ne sont pas toxiques sur les souris : ce qui témoigne d'interférences suivant les matrices de coquillages. Globalement, la procédure utilisée correspond aux exigences d'un test de routine mais sa faible reproductibilité ne permet pas de le proposer comme un test semi-quantitatif mais plutôt comme un essai de « screening » pour les espèces de coquillages les plus commercialisés comme les moules.	

**Abstract :**

A cytodetection test of diarrhoeic phycotoxins was developed by both IFREMER and Nantes University. Its principle is based on cell morphological changes of KB strain, induced by inhibition of protein-phosphatases involved in cytoskeleton building. This test has been shown sensitive, fast and specific for protein phosphatase inhibitors like diarrhoeic toxins (specialy okadaic acid in France). It shows a high repeatability and reproducibility with pure toxin for the cell strain is highly stable (.minimal active concentration or MAC = 125 ng OA.ml<sup>-1</sup>)

In order to evaluate the efficiency of transferring the method to coastal laboratories, the assay was subjected to a prevalidation study. The sampling, consisting of five species of shellfish, was carried out during two years in the context of the REPHY monitoring network and was therefore monitored by the mouse test. Samples extracts were divided between four laboratories which have performed on them the KB cytotoxicity test, independently and blindly . Extracts were also analysed by HPLC.

The results show 50% homogeneity between the operators, all the species considered. This weak value is probably due to the difficulty to appreciate the cell morphological differencies, corresponding to the MAC. When considering how to manage a ban shellfish farming areas , the comparison between KB test and mouse-test shows that KB test is more severe but does not show false negative. That is in agreement with the european recommandations. Nevertheless, extracts of some species ( *Glycymeris* and *Cerastoderma*), proved to be non toxic on mice but were active on KB cells, consequently, some interferences would exist in certain cases.

Globally, the procedure fits with the constraints of a routine teste but it cannot be considered as a semi quantitative-test because of its weak reproducibility. It is preferable to use it as a screening test for the most traded shellfish, like mussel.

**Mots-clés :**

Phycotoxine - acide okadaïque - test de cytodétection - prévalidation

Phycotoxin - okadaic acid - cytodetection assay - prevalidation

## Sommaire

<b>1. Introduction .....</b>	<b>3</b>
1.1. Le contexte de l'étude .....	3
1.2. Cytodétection des toxines diarrhéiques : la méthode de base de l'étude .....	5
1.3. Les points à étudier .....	7
<b>2. Matériel et méthode .....</b>	<b>7</b>
2.1. Démarche suivie pour la pré-validation .....	7
2.2. Expression des résultats .....	9
<b>3. Résultats, discussion .....</b>	<b>10</b>
3.1. Mise en place du test, résultats sur la toxine pure .....	10
3.2. Comparaison des résultats entre les opérateurs .....	10
3.3. Comparaison des résultats des tests KB et souris sur les fermetures des zones de production .....	12
3.4. Cohérence des résultats avec les autres essais, selon les espèces de coquillages .....	13
3.5. Corrélation entre les trois méthodes pour l'opérateur de référence .....	14
3.6. Corrélation entre les méthodes prises deux à deux selon les opérateurs .....	14
<b>4. Conclusion .....</b>	<b>15</b>
<b>5. Bibliographie .....</b>	<b>16</b>
<b>Annexe .....</b>	<b>17</b>



## **Participants**

<b>M. Bohec</b>	DEL/PN	tests
<b>M. Fortune</b>	DEL/NT	tests
<b>D. Le Gal</b>	DEL/CC	échantillonnage, tests, interprétation
<b>C. Marcaillou-Lebaut</b>	DEL/PN	coordination, interprétation, rédaction
<b>F. Mondeguer</b>	DEL/PN	analyses CLHP
<b>D. Morel</b>	SMAB	formation, tests
<b>Y.F. Pouchus</b>	SMAB	formation, interprétation, rédaction

Cette étude a bénéficié d'une subvention du Programme National sur les Efflorescences Algales Toxiques en 1997.

## **1. Introduction**

### **1.1. Le contexte de l'étude**

A certaines périodes de l'année, favorables au développement d'espèces toxiques du phytoplancton, l'accumulation des phycotoxines dans les coquillages peut avoir de graves conséquences sur les consommateurs. Le réseau de surveillance, le REPHY, mis en place par Ifremer doit disposer de méthode de détection présentant les propriétés requises pour un contrôle de routine, c'est-à-dire : fiabilité, simplicité, rapidité et modicité de coût.

Le risque d'intoxication par les toxines diarrhéiques étant le problème le plus fréquent sur le littoral français, une des préoccupations du PNEAT a été d'encourager la mise au point ou le développement d'un test de contrôle de ces toxines.

Actuellement, la présence éventuelle des toxines diarrhéiques dans les coquillages, repose sur un test-souris dont la procédure a été mise en place au Japon dès la connaissance de ce phénomène (Yasumoto *et al.*, 1978). Il consiste à injecter à trois souris de 20 g une quantité constante d'extrait de glandes digestives de coquillages contaminés et d'observer leur temps de survie pendant 24 heures. Si deux souris sur trois meurent, les coquillages sont interdits à la vente. Afin de fournir aux gestionnaires une réponse dans la journée, le seuil de décision a été abaissée à 5 heures sur la base d'une comparaison du test japonais avec un test sur souriceau utilisé en médecine pour détecter des toxines cholériques (Marcaillou *et al.*, 1985). Ce test a été utilisé dès la mise en place du réseau en 1984, toutefois, il présente un certain nombre d'inconvénients :



- lorsqu'il fait suite à une simple extraction à l'acétone, son manque de spécificité devient gênant car on observe des faux positifs en raison de la présence de composés, non identifiés, toxiques sur souris et peut être anodins pour l'homme. Ces faux positifs sont susceptibles de générer des fermetures momentanées de zones de production et sont donc préjudiciables pour les professionnels. En 1996, on y a partiellement remédié en procédant, au préalable, à une extraction plus sélective mais qui est plus longue et plus coûteuse ;
- sa reproductibilité est mauvaise dans les doses sublétales ;
- son seuil d'acceptabilité de 5 heures rend difficile sa traduction en unité souris définie comme la dose minimum d'acide okadaïque (AO) qui tue une souris de 20 g en 24 heures soit 4 µg d'AO. En fait, un intervalle de 0,8 à 1,6 µg/g de glande digestive permet de le situer en terme de concentrations en toxines ;
- il pose un problème d'éthique et la législation européenne est de plus en plus contraignante quant à l'utilisation de mammifères pour les tests de dépistage ;
- jusqu'à aujourd'hui, son utilisation n'est pas homogène dans tous les pays européens.

Des méthodes biologiques, plus faciles à adapter pour répondre aux contraintes de la surveillance que les méthodes chimiques, ont été proposées dans la littérature comme alternatives au test-souris. Elles reposent sur des techniques immunologiques ou biochimiques. Les kits ELISA (UDA, ROUGIER) mis sur le marché ont donné satisfaction lors des essais mais s'avèrent très onéreux (3 600 F les huit échantillons pour le kit japonais) et ne sont opérationnels que quelques semaines après leur achat. Des méthodes biochimiques sont en cours de développement mais elles utilisent une enzyme purifiée, relativement chère.

Dans le cadre d'une collaboration avec une équipe universitaire (URM 11)\* un essai sur culture cellulaire, adapté aux toxines diarrhéiques, a été développé (Amzil *et al.*, 1992). Dans sa réalisation, cet essai présente les principaux caractères d'un test de routine : il est simple, rapide et peu onéreux. Sa répétabilité est bonne puisque pour 95 % des échantillons traités en quatre exemplaires, trois résultats sur quatre ont été identiques, le quatrième étant différent de seulement une dilution. De plus, appliqué à d'autres toxines connues, seuls les inhibiteurs de protéines phosphatases liposolubles - famille à laquelle appartiennent les toxines diarrhéiques - donnent une réponse avec cet

---

\* Unité de Recherche Marine (réf. Ifremer : 93/1211796/N)



essai (Pouchus *et al.*, 1997). Le laboratoire peut être totalement autonome dans la réalisation du test si la culture cellulaire est maîtrisée. Il était donc naturel de le proposer comme alternative au test-souris et nous avons été encouragés dans cette voie par les recommandations de la commission d'évaluation de l'URM.

L'objectif de ce projet donc est de vérifier les acquis des travaux précédents sur un échantillonnage plus grand et plus diversifié et de tester sa reproductibilité afin d'apporter des éléments objectifs sur la possibilité de le transférer aux laboratoires côtiers de l'Ifremer chargés de la réalisation du REPHY. C'est une étape préliminaire à la mise en place d'une validation éventuelle d'où cet intitulé d'étude de pré-validation. La démarche suivie s'est déroulée en deux temps : formation de trois opérateurs dans trois laboratoires différents puis, mise à l'épreuve de l'essai sur des échantillons du REPHY.

Enfin, il est important de rappeler que l'étude a été démarrée avant que ne surgisse le problème de la détection de nouvelles toxines dont l'origine n'est toujours pas éclaircie mais qui a conduit la communauté européenne à recommander le test-souris précédé d'une extraction à l'acétone avec un seuil d'observation de 24 heures pour garantir la consommabilité des coquillages. Cette nouvelle procédure sera mise en place par le REPHY à partir de 2002 mais elle ne concerne pas l'étude présentée ici.

## **1.2. Cytodétection des toxines diarrhéiques : la méthode de base de l'étude**

La technique développée est basée sur les modifications de la morphologie de cellules mises en contact avec des toxines du type de l'acide okadaïque (AO) et de ses dérivés non estérifiés (DTX-1,2). Ces changements morphologiques sont induits par des phénomènes de phosphorylation des protéines du cytosquelette dus à l'inhibition des protéines-phosphatases cellulaires par les toxines. Comme le montre la figure 1, l'estimation de l'activité est réalisée en recherchant la concentration minimale d'extrait, nécessaire pour induire des changements visibles en microscopie optique sur une culture de cellules KB (Amzil *et al.*, 1992).



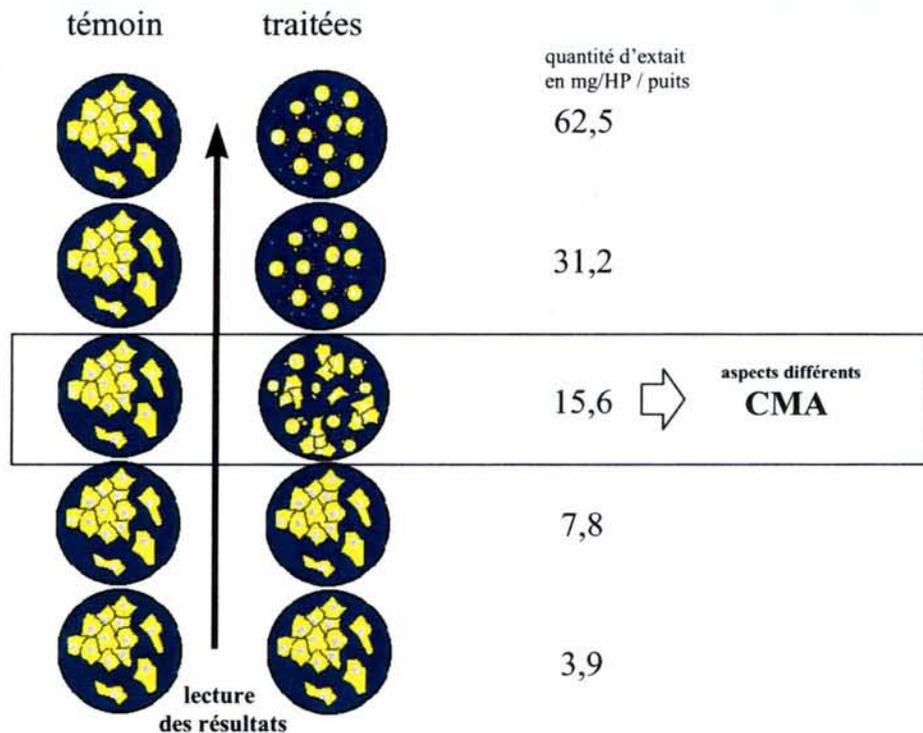


Figure 1 : Schéma de principe de la détermination de la CMA (Concentration Minimale Active) des extraits de moules sur les cellules KB.

La lignée cellulaire choisie appelée KB, provient d'un carcinome humain du rhino-pharynx (Eagle, 1955). La culture dans le milieu de base de Eagle (BME), en phase stationnaire se présente sous forme d'une monocouche de cellules polygonales, adhérent au fond de la boîte. Sous l'action de la toxine, le contour cellulaire s'arrondit et cette différence morphologique par rapport au témoin apparaît nettement par simple observation sous microscope optique. Cette lignée est très répandue, sa culture est aisée et d'une grande stabilité de réponse. Avant usage pour les tests, la culture doit être repiquée au moins deux fois à trois ou quatre jours d'intervalle afin d'obtenir une monocouche de cellules polygonales. Alors, ces cellules peuvent être remises en suspension après trypsination et distribuées dans les microplaques.

L'extraction des échantillons suit la procédure décrite pour l'analyse chimique aboutissant à un extrait pré-purifié des toxines recherchées (Marcaillou-Le Baut *et al.*, 1994). Cette extraction est plus spécifique des toxines diarrhéiques que la simple extraction à l'acétone et est pratiqué par le REPHY depuis 1996. Les glandes digestives sont d'abord extraites dans une solution de méthanol puis, après un lavage

à l'hexane pour éliminer les lipides indésirables, un partage liquide/liquide permet de concentrer les toxines dans le dichlorométhane. Les échantillons traités sont stockés sous forme d'extraits secs au congélateur en attendant d'être analysés.

Le test proprement dit est conduit dans des microplaques à 96 puits qui ont été incubées environ 24 heures avec, dans chaque puits, 50 µl de la suspension cellulaire de concentration connue. Après ce délai, 50 µl des dilutions des extraits (gamme de dilutions en progression géométrique d'ordre 1/2 dans le BME) sont rajoutés. Après quatre heures d'incubation à 37 °C, l'évaluation de la toxicité est réalisée en recherchant la concentration minimale active ou CMA qui est la concentration minimale en extrait testé nécessaire pour entraîner une modification visible de l'aspect de la culture (apparition de cellules arrondies (fig. 1)). Pour l'AO pur, la CMA dans ces conditions est de 125 ng.ml<sup>-1</sup> ou 12,5 ng dans le puits.

### 1.3. Les points à étudier

Les points à étudier pour cette pré-validation étaient :

- simplification de la technique de préparation des échantillons et du mode de calcul des résultats,
- réponse de l'essai sur des matrices différentes ( plusieurs espèces de coquillage),
- étude de cohérence des résultats obtenus sur une même série d'échantillons :
  - entre les laboratoires,
  - par rapport au test sur souris et à l'analyse chimique,
  - suivant les espèces de coquillages testés.

## 2. Matériel et méthode

### 2.1. Démarche suivie pour la pré-validation

En plus du laboratoire Phycotoxines et Nuisances, partenaire de l'URM, deux laboratoires côtiers Ifremer de Nantes et Concarneau se sont impliqués dans l'étude, celui de Concarneau ayant déjà expérimenté la technique avant le démarrage de ce projet. Le laboratoire partenaire de l'URM (Groupe de Recherche : Substance Marine à Activité Biologique de la Faculté de Pharmacie de Nantes) a fait office de laboratoire de référence.

### 2.1.1. Formation des agents concernés

Deux stages de formation ont été organisés pour les participants à la Faculté de Pharmacie, début 1997. Avant de procéder à la première série d'essais, les opérateurs se sont exercés à l'observation et à l'entretien de la culture puis ont recherché la CMA sur l'acide okadaïque pur.

### 2.1.2. Echantillonnage

Nous avons utilisé des échantillons traités par le REPHY, et donc soumis au test-souris, sur les années 1997 et 1998. La station de Concarneau a été retenue en raison de son expérience préalable et du fait que le contrôle porte sur plusieurs espèces de coquillages. Ainsi, cinq espèces ont pu être testées dont trois sont fréquentes sur le marché local. L'été 1997 s'est caractérisé par un développement modeste de *Dinophysis spp* sur tout le littoral français. Seule la station de Concarneau a pu constituer un échantillonnage conséquent, présentant quatre espèces de coquillages, mais assez pauvre en moules contaminées, espèce la plus fréquemment contrôlée et donc la plus intéressante pour la validation. En 1998, le développement de l'algue toxique a été très court mais très intense et a fourni quelques échantillons de moules très toxiques. La description synthétique de l'échantillonnage est présentée dans le tableau 1.

Espèces de coquillages	Nombre d'échantillons	Test-souris (T : temps de survie moyen)		
		T < 5 h	5 h < T < 24 h	T > 24 h
Amandes ( <i>Glycymeris glycymeris</i> )	9	0	3	6
Coques ( <i>Cerastoderma edule</i> )	6	0	0	6
Moules ( <i>Mytilus edulis</i> )	32	7	4	21
Olives ( <i>Donax trunculus</i> )	35	9	22	4
Palourdes ( <i>Ruditapes decussatus</i> )	5	1	1	3

Tableau 1 : Nature et nombre des échantillons REPHY 1997 et 1998 utilisés pour la pré-validation du test KB.

La liste détaillée des échantillons, avec la nature, les numéros de chacun et les résultats des différents tests, est donnée en annexe.

Le laboratoire de Concarneau a donc procédé à l'extraction, au test-souris et à la répartition de chaque échantillon en quatre aliquotes qui



ont été numérotés au hasard. Ainsi, chaque opérateur a reçu 64 tubes contenant l'extrait de 0,5 g de glande digestive à traiter en aveugle.

### 2.1.3. Simplifications apportées au protocole d'origine

La méthode initiale prévoyait d'exprimer les résultats par rapport au poids d'extrait sec. Les rendements d'extraction pouvant varier dans des proportions significatives (du fait de la teneur variable en composés liposolubles entre autres), il a été décidé de rapporter l'activité (la CMA) au poids de glandes digestives ayant servi à l'extraction. Ceci permet d'éviter les erreurs de pesées, possibles dans cette gamme de poids faible et d'alléger considérablement les calculs.

## 2.2. Expression des résultats

### 2.2.1 Tests de toxicité aiguë sur souris

Le test-souris utilisé, jusqu'alors, par le REPHY se déroule de la manière suivante : trois souris reçoivent une injection de 1 ml d'une solution d'extrait équivalent à 5 g d'hépatopancréas. Le temps de survie de chacune est relevé : si la moyenne des trois valeurs (T) est inférieure à 5 heures, le test est déclaré positif. Quand les trois souris survivent, on attribue à l'échantillon un temps de survie moyen arbitraire égal à 1 500 minutes (i.e. supérieure à 24 heures/1 440 minutes). Au-delà de 45 minutes de survie, on peut considérer que l'inverse du temps de survie est grossièrement proportionnel à la dose injectée. C'est pourquoi les études de corrélation entre l'activité sur souris et sur cellules sera faite à partir de l'inverse de ce temps moyen de survie.

### 2.2.2. Tests sur cellules

La CMA sur cellules KB de l'acide okadaïque étant de 12,5 ng dans le puits, il est possible à partir des CMA déterminées pour chaque extrait de calculer la quantité équivalente d'acide okadaïque en  $\mu\text{g.g}^{-1}$  d'hépatopancréas par la formule :

$$C_{\mu\text{gAO/gHP}} = 12,5 / \text{CMA}$$

Du fait de la réalisation du test par dilutions successives au demi, les résultats possibles correspondent à une liste non linéaire de concentrations en acide okadaïque allant de 0,2 à 6,4  $\mu\text{g.g}^{-1}$  en progression géométrique d'ordre 2 (liste des valeurs possibles :

< = 0,2 = inactif à la plus faible concentration, 0,2 - 0,4 - 0,8 - 1,6 - 3,2 et 6,4  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ).



Chaque ligne de la microplaque reçoit toujours la même dilution de l'extrait. On peut donc faire correspondre à la lettre désignant une ligne, la quantité d'extrait contenue dans la dilution (tabl. 2).

Lignes	Quantités d'hépatopancréas, en mg	Concentration en AO en $\mu\text{g.g}^{-1}$
A	Témoin	0
B	62,5	0,2
C	31,2	0,4
D	15,6	0,8
E	7,8	1,6
F	3,9	3,2
G	1,9	6,4
H	Témoin	0

Tableau 2 : Quantités d'extrait injectées dans chaque ligne de la microplaque et concentrations équivalentes en AO, correspondant à la CMA.

### 3. Résultats, discussion

#### 3.1. Mise en place du test, résultats sur la toxine pure

La formation des opérateurs et la prise en main du test se sont déroulées sans problème majeur. L'autonomie des expérimentateurs s'est révélée quand, à la suite de contaminations accidentelles des cellules, ils ont su relancer les cultures à partir d'inoculum fourni par un autre laboratoire. Tout au long de l'exercice, des solutions standards de toxine pure ont été introduites dans les essais : la valeur de la CMA trouvée a toujours été celle affichée par le laboratoire de référence depuis la mise au point du test en 1993 et ce, quel que soit l'opérateur. Ceci prouve la très bonne stabilité de la souche et témoigne de la bonne répétabilité et reproductibilité du test sur la toxine pure.

#### 3.2. Comparaison des résultats entre les opérateurs

L'homogénéité des réponses des quatre opérateurs a été testée par une analyse de variance des rangs (test de Friedman, 1956), les données étant appariées. Les données se rapportant aux palourdes n'ont pas été prises en considération pour l'application de ce test non paramétrique car, unanimement, les opérateurs ont eu des difficultés à lire la CMA sur ces échantillons.



78 échantillons au total ont donc été pris en compte. Le test de Friedman montre que les réponses des quatre opérateurs diffèrent entre elles, au risque de 5 % (ddl = 3). Une analyse qualitative des résultats nous éclaire sur la dispersion des réponses.

Les résultats du test de cytotoxicité ont été classés en trois catégories (tabl. 3) qui se définissent comme suit :

- 1) ils sont identiques,
- 2) ils présentent une dilution de différence,
- 3) ils présentent plus d'une dilution de différence.

Critères Espèces	Quatre résultats identiques (1)	Une dilution de différence (2)	Total (1) + (2)	Plus d'une dilution de différence	Totaux
Amandes	0	3	3	6	<b>9</b>
Coques	1	1	2	4	<b>6</b>
Moules	6	12	18	14	<b>32</b>
Olives	1	19	20	15	<b>35</b>
Palourdes	0	1	1	4	<b>5</b>
<b>Totaux</b>	<b>8</b>	<b>36</b>	<b>44</b>	<b>43</b>	<b>87</b>
<b>%</b>	<b>9,2</b>	<b>41,4</b>	<b>50,6</b>	<b>49,4</b>	

Tableau 3 : Nombre de résultats obtenus avec le test KB, par les quatre opérateurs et par catégorie, sur cinq espèces de coquillages.

Si l'on considère qu'une dilution de différence est acceptable pour un test de cette nature, les catégories 1 et 2 montrent un pourcentage d'homogénéité d'un peu plus de 50 % (N = 87).

Ce taux est faible. Il peut s'expliquer par la difficulté d'appréciation de la CMA pour certains échantillons. En effet, parfois l'arrondissement des cellules n'est pas net mais on observe une détérioration diffuse du contour cellulaire puis un éclatement. Avant l'éclatement, cet effet peut être interprété comme étant celui de l'AO alors qu'en fait, il est peut être dû à d'autre(s) substance(s) contenue(s) dans l'extrait.



### 3.3. Comparaison des résultats des test KB et souris sur les fermetures des zones de production

Nous n'avons retenu, pour cet exercice, que les résultats des tests pratiqués sur des moules et des olives car la taille de l'échantillonnage des autres espèces est insuffisante. Le seuil 5 h du test-souris correspondant approximativement à un intervalle de concentration en AO compris entre 0,8 et 1,6  $\mu\text{g.g}^{-1}$ , les résultats inférieurs à l'un ou l'autre seuil, obtenus par l'observateur de référence, ont été dénombrés puis mis en parallèle avec le dénombrement des résultats correspondant aux trois catégories distinguées par le REPHY dans l'utilisation du test souris (tabl. 4).

#### MOULES

Test-souris (T= temps de survie moyen)		Test de cytodétection			
Conditions d'autorisation	Nombre d'échantillons	CMA > 0,8 $\mu\text{g.g}$ Nombre d'échantillons		CMA > 1,6 $\mu\text{g.g}$ Nombre d'échantillons	
		autorisés	interdits	autorisés	interdits
T > 24 h	21	17	4	21	0
5 < t < 24 h	3	0	3	2	1
Total	24	17	7	23	1
Condition de rejet					
T < 5 h	8	0	8	0	8

#### OLIVES

Test-souris (T= temps de survie moyen)		Test de cytodétection			
Conditions d'autorisation	Nombre d'échantillons	CMA > 0,8 $\mu\text{g.g}$ Nombre d'échantillons		CMA > 1,6 $\mu\text{g.g}$ Nombre d'échantillons	
		autorisés	interdits	autorisés	interdits
T > 24 h	4	2	2	3	1
5 < t < 24 h	20	0	18	8	12
Total	24	2	20	11	13
Condition de rejet					
T < 5 h	11	0	11	1	10

Tableau 4 : Nombre d'échantillons acceptés ou refusés pour le marché selon les résultats des tests-souris et du test KB.

Pour les moules, 7 ou 1 échantillon(s), selon le seuil choisi, (de 0,8 ou 1,6) aurai(en)t été interdit(s) par le test KB, en plus des 8 échantillons déclarés positifs d'après le test-souris et le seuil 5 h.

Pour les olives, 20 ou 13 échantillons, selon le seuil choisi, auraient été interdits par le test KB, en plus des 11 échantillons déclarés positifs d'après le test-souris et le seuil 5 h. L'échantillon d'olives, toxique sur souris (T < 5 h) mais théoriquement autorisé à la vente si l'on se fixe un

seuil supérieur à  $1,6 \mu\text{g.g}^{-1}$  ferait, sans doute, l'objet d'une décision allant dans le sens d'une interdiction en considérant la variation du test et le résultat à la limite du seuil.

Le test de cytotoxicité est donc plus sévère mais il ne présente pas de faux négatif. Ceci va dans le sens des recommandations européennes qui tendent à diminuer le seuil d'acceptabilité en toxine pour la mise sur le marché des coquillages.

### 3.4. Cohérence des résultats avec les autres essais, selon les espèces de coquillages

Certains échantillons, sans effet sur les souris et ne présentant que des traces d'AO, sont détectés comme plus ou moins toxiques avec le test KB. Cette observation s'applique particulièrement aux amandes (tabl. 5). Nous sommes peut être là en présence d'un effet sur les cellules KB qui n'est pas celui de l'AO et qui ne devrait pas se lire comme tel à l'examen microscopique.

Le test de cytotoxicité présenterait des interférences selon les matrices testées.

Espèce	N°	Test-souris min	HPLC $\mu\text{g/g}$	Test KB après conversion en $\mu\text{g/g}$			
				CC	NT	Fac	PN
Amandes	97/8	1 500	0,07	1,6	1,6	0,8	1,6
	97/9	1 500	0,1	1,6	3,2	1,6	1,6
	97/21	1 500	0,07	3,2	1,6	1,6	0,4
	97/35	1 500	-	3,2	0,4	3,2	0,8
	97/43	1 500	0,07	3,2	1,6	1,6	0,4
	97/49	1 500	0,2	3,2	6,4	3,2	1,6
	97/27	1 200	0,07	3,2	3,2	3,2	6,4
	97/28	760	0,1	1,6	6,4	1,6	3,2
	98/33	630	0,1	0,2	3,2	3,2	3,2
	Coques	97/73	1 500	0,2	6,4	0,4	6,4
98/6		1 500	0,2	1,6	3,2	1,2	6,4
Moules	97/57	1 500	0,3	6,4	6,4	0,4	3,2
	98/8	1 500	0,2	1,6	3,2	1,6	3,2
Palourdes	97/33	1 500	0,2	1,6	1,6	0,8	0,4
	98/46	1 500	0,2	0,2	0,8	0,4	1,6

Tableau 5 : Résultats des trois essais des échantillons en incohérence avec le test-souris.

### 3.5. Corrélation entre les trois méthodes pour l'opérateur de référence

Les trois méthodes sont le test KB, le test-souris et l'analyse chimique (CLHP), corrélées deux à deux. Les coefficients ont été calculés pour l'échantillonnage de moules, d'olives puis pour la somme des deux espèces de coquillages (tabl. 6).

Espèce Méthode	Moule			Olive			Moule + Olive		
	CLHP	KB	$\frac{1000}{T}$	CLHP	KB	$\frac{1000}{T}$	CLHP	KB	$\frac{1000}{T}$
CLHP	X	0,86	0,86	X	0,38	0,28	X	0,61	0,56
KB		X	0,83		X	0,78		X	0,80

Tableau 6 : Corrélation entre les trois méthodes prises deux à deux, sur les résultats obtenus par l'opérateur de référence (coefficients de corrélation sur n = 16 pour les moules, n = 33 pour les olives, n = 49 pour le total).

Ils sont homogènes et satisfaisants pour les moules seules. Pour les olives, ils laissent apparaître une mauvaise corrélation entre les tests biologiques (KB, Souris) et l'analyse chimique, ce qui corrobore l'idée que certains coquillages contiennent des substances actives autres que l'AO.

### 3.6. Corrélation entre les méthodes prises deux à deux selon les opérateurs

Cet exercice a été réalisé sur les moules seules puisqu'avec cette espèce on observe la meilleure corrélation entre les méthodes (tabl. 7).

	1	2	3	4
KB / $\frac{1000}{T}$	0,83	0,32	0,74	0,86
KB / CLHP	0,86	0,35	0,48	0,57

Tableau 7: Coefficients de corrélation entre les méthodes prises deux à deux pour chaque opérateur (n = 16).

L'influence de substances autres que l'AO, actives sur les cellules KB semble se confirmer. Il apparaît nettement que l'opérateur de référence cerne mieux la CMA car ses corrélations entre les deux tests biologiques d'une part, le test KB et l'analyse chimique d'autre part, sont bonnes. En revanche, pour l'un des opérateurs, les mauvaises corrélations obtenues traduisent l'observation d'un effet sur les cellules, qui a été systématiquement imputé à l'AO. Il semblerait donc, que malgré un bon entraînement, l'observation de l'arrondissement des cellules imputable aux toxines diarrhéiques comme l'AO, reste difficile à normaliser.

#### **4. Conclusion**

La validation d'une méthode s'appuie sur un protocole normalisé qui est assez lourd à mettre en œuvre. La mise au point du test de cytodétection avait démontré que l'essai présentait certaines qualités, qui pouvaient en faire un bon test alternatif dans la détection des toxines diarrhéiques, mais qu'il fallait s'appuyer sur des résultats complémentaires pour passer à la phase de validation.

L'étude de pré-validation du test de cytodétection de l'AO a donc été décidée pour mettre à l'épreuve la procédure dans des conditions réelles de contrôle à savoir : 1) vérifier sa reproductibilité et 2) tester ses réponses sur un plus grand nombre d'échantillons et sur des espèces de coquillages, autres que les moules.

La méthode à proprement parler, répond aux exigences basiques d'une méthode de routine. Elle est simple, rapide et d'un coût modique. La souche cellulaire utilisée présente une très grande stabilité dans sa réponse à la toxine purifiée.

Les résultats obtenus au cours de deux années de contrôle dans une station côtière, ne comprennent aucun faux positif.

Par ailleurs, le test est plus sévère que le test-souris mais ce n'est pas un inconvénient dans la perspective d'une diminution du seuil de décision du test-souris (passage de 5 à 24 heures pour le délai d'observation des souris).

Toutefois, les résultats de la pré-validation sont insuffisants pour décider de transférer le test en utilisation alternative au test-souris. En effet, l'exercice a montré que pour certaines espèces de coquillages les



résultats ne sont pas interprétables (exemple des amandes et des coques). De plus, l'analyse statistique et qualitative des résultats met en évidence une divergence globale de lecture entre les opérateurs qui empêche d'accepter le test en tant qu'outil de décision. Ceci s'explique par l'existence occasionnelle de substances qui interfèrent avec l'effet de l'AO et rendent ainsi l'appréciation de la CMA très subjective (contour cellulaire granuleux plutôt qu'arrondi par exemple). En revanche, le test peut être utilisé comme test de screening pour éviter de contrôler, par d'autres méthodes plus contraignantes, les échantillons négatifs.

Enfin, des améliorations sont proposées pour palier les inconvénients cités plus haut.

La facilitation de la lecture de la CMA peut être apportée par l'introduction systématique d'un standard dans chaque microplaque qui constituerait une référence pour l'appréciation de la CMA. Par ailleurs, l'introduction d'une mesure colorimétrique de l'effet de l'AO est à l'étude. Comme la réponse du test est de type oui/non, une seule dilution de l'extrait correspondant au seuil de décision serait suffisante et permettrait de tester un plus grand nombre d'échantillons, en triplicats, sur une même microplaque.

## 5. Bibliographie

- Amzil Z., Pouchus Y.F., Le Boterff J., Roussakis C., Verbist J.F., Le Baut C., Masselin P., 1992. Short-time cytotoxicity of mussels extracts: a new bio-assay for okadaic acid detection. *Toxicon*, 30 (11), 1419-1425.
- Eagle H., 1955. Propagation in fluid medium of a human epidermoid carcinoma strain KB. *Proc. Biol. Med.*, 89, 362-364.
- Marcaillou-Lebaut C., Lucas D., Le Déan L., 1985. *Dinophysis accuminata* toxin. Status of toxicity bioassays in France. *In: Toxic dinoflagellates*. Anderson D.M., White A.W. & Baden D.G. (eds), Elsevier, New York, 485-488.
- Marcaillou-Lebaut C., Amzil Z., Vernoux J.P., Pouchus Y.F., Bohec M., Simon J.F., 1994. Studies on the detection of okadaic acid in mussels: Preliminary comparison of bioassays Natural. *Toxins*, 2, 312-317.
- Pouchus Y.F., Amzil Z., Marcaillou-Lebaut C., James K.J., Verbist J.F., 1997. Specificity of cytodetection on KB cells using morphological changes for lipophylic protein phosphatase inhibitors detection. *Toxicon*, 35 (7), 1137-1142.
- Yasumoto T., Oshima Y., Yamagushi M., 1978. Occurrence of a new type of shellfish poisoning in Tohoku district. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*, 44, 1249-1255.



**ANNEXE****Tableau des données**

Evaluation de la toxicité d'échantillons de coquillages contrôlés par le REPHY en 1997 et en 1998 dans le secteur de Concarneau par trois essais :

- 1) test de cytodétection : résultats désignés par lettre de la ligne de la microplaque correspondant à la CMA et traduits en concentrations selon les quatre opérateurs, le numéro 1 étant l'opérateur de référence.
- 2) test-souris : résultats exprimés par rapport au temps moyen de survie (T, temps moyen de survie de trois souris injectées).
- 3) analyse chimique.



	échantillon		puits/ligne				en µg/g d'AO				souris		CLHP
	num		op 1	op 2	op 3	op 4	op 1	op 2	op 3	op 4	min	300/T	µg/g
MOULES	97	5	D	D	B	E	0.8	0.8	0.2	1.6	1500	0.2	
MOULES	97	6	C	C	B	D	0.4	0.4	0.2	0.8	1500	0.2	
MOULES	98	8	E	E	F	F	1.6	1.6	3.2	3.2	1500	0.2	0,1
MOULES	97	11	D	D	D	D	0.8	0.8	0.8	0.8	1500	0.2	
MOULES	97	13	D	E	C	C	0.8	1.6	0.4	0.4	1500	0.2	
MOULES	97	15	D	E	D	C	0.8	1.6	0.8	0.4	1500	0.2	
MOULES	97	16	D	D	C	D	0.8	0.8	0.4	0.8	1500	0.2	
MOULES	97	23	D	D	F	F	0.8	0.8	3.2	3.2	1500	0.2	0.20
MOULES	97	31	B	C	B	C	0.2	0.4	0.2	0.4	1500	0.2	
MOULES	97	32	B	B	B	C	0.2	0.2	0.2	0.4	1500	0.2	
MOULES	97	37	C	E	D	C	0.4	1.6	0.8	0.4	1500	0.2	
MOULES	97	41	E	E	B	E	1.6	1.6	0.2	1.6	1500	0.2	
MOULES	97	42	D	D	C	C	0.8	0.8	0.4	0.4	1500	0.2	
MOULES	97	45	D	E	E	E	0.8	1.6	1.6	1.6	1500	0.2	
MOULES	97	53	E	E	D	D	1.6	1.6	0.8	0.8	1500	0.2	
MOULES	97	57	C	G	G	F	0.4	6.4	6.4	3.2	1500	0.2	0.30
MOULES	97	62	D	D	D	D	0.8	0.8	0.8	0.8	1500	0.2	
MOULES	97	63	D	D	C	D	0.8	0.8	0.4	0.8	1500	0.2	
MOULES	97	64	D	G	D	D	0.8	6.4	0.8	0.8	1500	0.2	0.30
MOULES	97	65	C	D	E	C	0.4	0.8	1.6	0.8	1500	0.2	
MOULES	97	74	E	G	D	D	1.6	6.4	0.8	0.4	1500	0.2	0.30
MOULES	97	54	E	G	E	E	1.6	6.4	1.6	1.6	1180	0.3	0.60
MOULES	98	11	E	E	E	D	1.6	1.6	1.6	0.8	720	0.4	0.05
MOULES	98	45	F	G	F	D	3.2	6.4	3.2	0.8	321	0.9	0.30
MOULES	98	53	E	E	F	E	1.6	1.6	3.2	1.6	308	1.0	0.30
MOULES	97	36	G	F	E	C	6.4	3.2	1.6	0.4	278	1.1	1.20
MOULES	97	46	F	F	E	C	3.2	3.2	1.6	0.4	157	1.9	1.20
MOULES	98	39	G	G	G	G	6.4	6.4	6.4	6.4	100	3.0	1.00
MOULES	98	14	F	F	G	G	3.2	3.2	6.4	6.4	93	3.2	1.00
MOULES	98	31	G	G	G	G	6.4	6.4	6.4	6.4	91	3.3	1.10
MOULES	98	20	G	G	G	G	6.4	6.4	6.4	6.4	72	4.2	1.40
MOULES	98	26	G	G	G	G	6.4	6.4	6.4	6.4	70	4.3	1.40
OLIVES	98	1	D	D	F	D	0.8	0.8	3.2	0.8	1500	0.2	
OLIVES	97	4	E	E	E	D	1.6	1.6	1.6	0.8	1500	0.2	
OLIVES	97	12	F	F	E	F	3.2	3.2	1.6	3.2	1500	0.2	0.90
OLIVES	97	22	C	D	C	D	0.4	0.8	0.4	0.8	1500	0.2	
OLIVES	97	75	E	F	E	F	1.6	3.2	1.6	3.2	1280	0.2	0.05
OLIVES	97	56	F	G	F	F	3.2	6.4	3.2	3.2	1180	0.3	0.60
OLIVES	97	39	E	F	F	F	1.6	3.2	3.2	3.2	1080	0.3	1.60
OLIVES	97	3	E	E	D	D	1.6	1.6	0.8	0.8	960	0.3	0.90
OLIVES	97	55	F	F	G	E	3.2	3.2	6.4	1.6	860	0.3	0.70
OLIVES	97	10	E	F	G	E	1.6	3.2	6.4	1.6	840	0.4	0.40
OLIVES	97	60	F	F	E	F	3.2	3.2	1.6	3.2	840	0.4	1.10
OLIVES	97	50	F	F	F	D	3.2	3.2	3.2	0.8	800	0.4	0.80
OLIVES	98	32	E	G	F	G	1.6	6.4	3.2	6.4	720	0.4	0.10
OLIVES	98	73	E	G	G	G	1.6	6.4	6.4	6.4	720	0.4	
OLIVES	97	48	F	F	G	D	3.2	3.2	6.4	0.8	675	0.4	0.90
OLIVES	98	30	D	F	F	G	0.8	3.2	3.2	6.4	660	0.5	0.10
OLIVES	97	1	F	E	D	E	3.2	1.6	0.8	1.6	540	0.6	0.80
OLIVES	98	28	F	G	G	F	3.2	6.4	6.4	3.2	460	0.7	0.20
OLIVES	97	7	E	E	E	F	1.6	1.6	1.6	3.2	430	0.7	0.70
OLIVES	97	30	F	E	E	C	3.2	1.6	1.6	0.4	420	0.7	0.80
OLIVES	98	72	F	F	F	G	3.2	3.2	3.2	6.4	416	0.7	
OLIVES	98	13	F	E	E	E	3.2	1.6	1.6	1.6	403	0.7	0.20
OLIVES	98	70	F	G	G	G	3.2	6.4	6.4	6.4	340	0.9	0.30
OLIVES	97	47	F	F	D	D	3.2	3.2	0.8	0.8	320	0.9	0.20
OLIVES	97	2	F	F	E	F	3.2	3.2	1.6	3.2	306	1.0	0.60
OLIVES	98	21	F	G	F	E	3.2	6.4	3.2	1.6	303	1.0	0.30
OLIVES	97	38	E	F	E	G	1.6	3.2	1.6	6.4	245	1.2	
OLIVES	97	58	F	F	G	F	3.2	3.2	6.4	3.2	232	1.3	1.10
OLIVES	97	40	F	F	F	F	3.2	3.2	3.2	3.2	220	1.4	1.10
OLIVES	98	27	F	G	F	F	3.2	6.4	3.2	3.2	215	1.4	0.50
OLIVES	97	18	F	F	D	F	3.2	3.2	0.8	3.2	187	1.6	1.00
OLIVES	97	29	F	F	E	D	3.2	3.2	1.6	0.8	175	1.7	0.80
OLIVES	97	19	G	G	F	E	6.4	6.4	3.2	1.6	130	2.3	
OLIVES	97	25	G	F	F	D	6.4	3.2	3.2	0.8	118	2.5	1.30
OLIVES	97	17	G	G	F	F	6.4	6.4	3.2	3.2	87	3.4	0.50
PALOURDES	97	33	D	E	E	C	0.8	1.6	1.6	0.4	1500	0.2	0.30
PALOURDES	98	46	C	B	D	E	0.4	0.2	0.8	1.6	1500	0.2	
PALOURDES	98	47	B	B	B	D	0.2	0.2	0.2	0.8	1500	0.2	
PALOURDES	97	26	F	F	E	D	3.2	3.2	1.6	0.8	970	0.3	0.20
PALOURDES	97	20	G	G	C	E	6.4	6.4	0.4	1.6	280	1.1	0.40
COQUES	98	6	E	E	F	G	1.6	1.6	3.2	6.4	1500	0.2	
COQUES	97	24	C	C	C	F	0.4	0.4	0.4	3.2	1500	0.2	0.10
COQUES	97	34	D	E	C	C	0.8	1.6	0.4	0.4	1500	0.2	
COQUES	97	44	D	D	D	D	0.8	0.8	0.8	0.8	1500	0.2	
COQUES	97	61	B	C	C	C	0.2	0.4	0.4	0.4	1500	0.2	
COQUES	97	73	G	G	C	F	6.4	6.4	0.4	3.2	1500	0.2	0.20
AMANDES	97	8	D	E	E	E	0.8	1.6	1.6	1.6	1500	0.2	0.10
AMANDES	97	9	E	E	F	E	1.6	1.6	3.2	1.6	1500	0.2	0.10
AMANDES	97	21	E	F	E	C	1.6	3.2	1.6	0.4	1500	0.2	0.10
AMANDES	97	35	F	F	C	D	3.2	3.2	0.4	0.8	1500	0.2	
AMANDES	97	43	E	F	E	C	1.6	3.2	1.6	0.4	1500	0.2	0.10
AMANDES	97	49	F	F	G	E	3.2	3.2	6.4	1.6	1500	0.2	0.20
AMANDES	97	27	F	F	F	G	3.2	3.2	3.2	6.4	1200	0.3	0.10
AMANDES	97	28	E	E	G	F	1.6	1.6	6.4	3.2	760	0.4	0.10
AMANDES	98	33	F	B	F	F	3.2	0.2	3.2	3.2	630	0.5	0.10