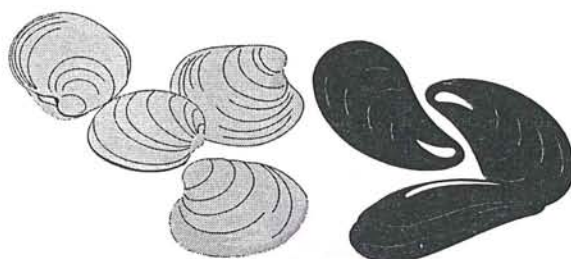


**DIRECTION DE L'ENVIRONNEMENT
ET DE L'AMENAGEMENT LITTORAL**

Cytodétection des phycotoxines diarrhéiques
Une alternative au test de toxicité aiguë sur souris pour la
surveillance de la salubrité des coquillages

par

Zouher AMZIL



FICHE DOCUMENTAIRE

Type de rapport : R S T	
Numéro d'identification du rapport : R.INT.DEL/96.08/Nantes Diffusion : libre <input checked="" type="checkbox"/> restreinte <input type="checkbox"/> interdite <input type="checkbox"/> Validé par : Adresse électronique : - chemin UNIX : - adresse WWW :	date de publication septembre 1996 nombre de pages 27 pages bibliographie Oui illustration(s) Oui 4 figures - 3 tableaux langue du rapport français
Titre et sous-titre du rapport : Cytodétection des phycotoxines diarrhéiques Une alternative au test de toxicité aiguë sur souris pour la surveillance de la salubrité des coquillages Titre traduit : Cytodetection of diarrheic phycotoxins An alternative to the acute toxicity mouse-test for monitoring of shellfish health	
Auteur(s) principal(aux) : nom, prénom <p align="center">AMZIL Zouher</p>	Organisme / Direction / Service, laboratoire IFREMER - Centre de Nantes DEL/PN
Collaborateur(s) : nom, prénom	Organisme / Direction / Service, laboratoire
Organisme commanditaire : nom développé, sigle, adresse	
Titre du contrat :	n° de contrat Ifremer
Organisme(s) réalisateur(s) : nom(s) développé(s), sigle(s), adresse(s)	
Responsable scientifique :	
Cadre de la recherche : Programme : Convention : Projet : Autres (préciser) : Campagne océanographique : (nom de campagne, année, nom du navire)	

FICHE DOCUMENTAIRE

Résumé :

Le test de **cytodétection** sur cellules KB des **phycotoxines diarrhéiques** (test DRAME) a été mis au point pour remplacer à terme le test de toxicité sur souris, actuellement pratiqué par le réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines (REPHY) de l'IFREMER. Il est basé sur les modifications de la morphologie de cellules qui sont induites par des phénomènes de phosphorylations des protéines du cytosquelette dus au **blocage des protéines-phosphatases** cellulaires par les toxines de type acide okadaïque. Cette méthode est **spécifique, sensible et rapide** puisque les résultats sont donnés dans la journée. Elle est également bien corrélée avec le test de toxicité aiguë sur souris et avec les dosages par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) des phycotoxines diarrhéiques. Elle a été récompensée par l'unique mention spéciale du jury du **6ème prix AMALTHEE** de l'Oeuvre Pour l'Assistance aux Animaux de Laboratoire (OPAL).

L'étude proposée correspond donc à un essai de mise en place, dans des conditions réelles d'utilisation, de cette méthode de cytodétection de l'acide okadaïque dans les coquillages contaminés.

Abstract :

The cytodetection test of diarrheic phycotoxin KB-cells (DRAME test) was developed to ultimately provide a substitute for the acute toxicity mouse-test currently used by IFREMER's phytoplankton monitoring network (REPHY). The cytodetection test relies on the cell morphological changes induced by the phosphorylation of cytoskeleton proteins resulting from the inhibition of cell protein-phosphatases by okadaic-type toxins. The method is specific, sensitive and fast with results given on the same day. In addition, the method has been shown to produce a good correlation with the acute toxicity mouse-test as well as with HPLC analyses of diarrheic phycotoxins. The cytodetection test was awarded the only Special Prize of the Jury at the 6th AMALTHEE Awards organized by OPAL (Oeuvre pour l'Assistance aux Animaux de Laboratoire - Fund for Assistance to Laboratory Animals).

The proposed study concerns an experimental trial of this okadaic acid cytodetection method in contaminated shellfish under real-scale conditions of application.

Mots-clés :

Acide okadaïque, inhibition des protéines phosphatases, cytodétection, cellules KB.

Keywords :

Okadaic acid, inhibition of protein-phosphatase, cytodetection KB-cells

Commentaire :

Sommaire

I. Contexte de l'étude	5
II. Détection de l'acide okadaïque : méthodes proposées pour remplacer le test-souris	6
III. Cytodétection des phycotoxines diarrhéiques sur cellules KB	7
III.1. L'acide okadaïque : un inhibiteur des protéines phosphatases	7
III.2. Cinétique de l'action de l'acide okadaïque sur les cellules KB	9
III.3. Méthode développée	11
III.4. Validation de la méthode	15
III.4.1. Reproductibilité	15
III.4.2. Sensibilité	16
III.4.3. Corrélation entre CMA et la concentration en acide okadaïque	16
III.4.4. Spécificité	17
III.5. Conclusion	20
IV. Etude pilote du test de cytodétection des toxines diarrhéiques	22
V. Recommandations	23
Références bibliographiques	24

I. Contexte de l'étude

Un problème de santé publique...

"Par arrêté préfectoral, le ramassage et la vente des moules sont interdits sur la côte entre ... et ..., du fait de la présence d'une algue toxique du genre *Dinophysis*."

Nous avons tous entendu ou lu ces communiqués de presse qui fleurissent dès le printemps. **Mais que cache cette interdiction ?**

Tout d'abord **une microalgue** qui prolifère le long des côtes dès que les conditions lui sont favorables et qui synthétise une toxine, principalement l'acide okadaïque. Ces algues microscopiques, et donc la toxine qu'elles contiennent, sont concentrées par les coquillages filtreurs chez qui elles ne semblent produire aucun effet. Les consommateurs des moules contaminées sont en revanche très sensibles à cette toxine qui provoque chez eux un **syndrome gastro-intestinal** se traduisant principalement par des diarrhées d'où le nom de **toxines diarrhéiques** (Yasumoto *et al.*, 1978, 1980; Lassus *et al.*, 1985, 1988; Sournia *et al.*, 1991). De plus, depuis quelques années, de nombreux travaux menés sur les propriétés de l'acide okadaïque ont permis de montrer que cette substance serait un **promoteur tumoral** (Saganuma *et al.*, 1988; Rogers *et al.*, 1994).

Dès lors, la surveillance des zones de productions des coquillages devient donc un **problème de santé publique**.

En France, c'est l'IFREMER qui, dès 1983 dans le cadre de ses missions, a mis en place un réseau de surveillance de phytoplancton et des phycotoxines (REPHY) pour déceler la présence de coquillages toxiques et proposer aux autorités départementales (Affaires Maritimes), la fermeture d'une zone de pêche en cas de risque pour les consommateurs.

Le test de détection utilisé dans le cadre de cette surveillance consiste en une injection par voie intrapéritonéale d'extraits de coquillages à des souris (Marcaillou-Le Baut *et al.*, 1985). Si celles-ci meurent dans un délai inférieur ou égal à cinq heures, les coquillages sont considérés comme impropres à la consommation et interdits à la vente. Les tests de toxicité sont reconduits et la zone de production n'est réouverte qu'après deux résultats négatifs consécutifs.

Cette technique d'évaluation de la toxicité aiguë sur souris est pratiquée dans différents pays et elle est de plus en plus critiquée pour son manque de spécificité et sa faible sensibilité (Takagi *et al.*, 1984). De plus, cette méthode devrait être abandonnée à cause des nouvelles réglementations européennes régissant l'utilisation des animaux de laboratoire. C'est pourquoi des travaux sont menés pour la mise au point de méthodes alternatives afin de remplacer le test-souris.

Nous avons donc entrepris la mise au point d'une nouvelle technique de détection des toxines diarrhéiques qui possède les critères de spécificité, de sensibilité, de rapidité et de moindre coût sans nécessiter l'usage d'animaux vivants. Cette méthode a été baptisée DRAME : Détection Rapide de l'Acide okadaïque dans les Moules après Extraction. Elle a été récompensée par l'unique mention spéciale du jury du **6ème prix AMALTHEE** de l'Oeuvre Pour l'Assistance aux Animaux de Laboratoire (OPAL).

Cette technique est basée sur les modifications de la morphologie de cellules humaines KB (lignée cancéreuse du nasopharynx) mises en contact avec des toxines du type de l'acide okadaïque. Ces changements morphologiques sont induits par des phénomènes de phosphorylations des protéines du cytosquelette dus au blocage des protéines-phosphatases cellulaires par les toxines de type acide okadaïque. 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.

Cette méthode est spécifique des toxines de type acide okadaïque, sensible et rapide puisque les résultats sont donnés dans la journée. Elle est également bien corrélée avec le test de toxicité aiguë sur souris et avec les dosages des phycotoxines diarrhéiques par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) (Amzil *et al.*, 1992; Amzil, 1993; Marcaillou-Le Baut *et al.*, 1994; Pouchus *et al.*, 1996).

C'est pourquoi elle a été retenue par l'IFREMER afin de la tester dans les laboratoires côtiers pour qu'elle puisse remplacer à court terme le test souris.

L'étude proposée correspond donc à un essai de mise en place, dans des conditions réelles d'utilisation, de cette méthode de cytodétection de l'acide okadaïque dans les coquillages contaminés.

Dans un premier temps, nous allons rappeler les méthodes existantes de détection de l'acide okadaïque ainsi que le test de cytodétection des phycotoxines diarrhéiques sur cellules KB que nous avons mis au point.

II. Détection de l'acide okadaïque : les méthodes proposées pour remplacer le test souris

- **L'analyse en Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) avec détection en fluorimétrie après dérivation des toxines par un chromophore (ADAM)** (Lee *et al.*, 1987; Stabell *et al.*, 1991; Croci *et al.*, 1995) : cette méthode a l'avantage d'être spécifique, sensible mais présente de nombreux inconvénients : elle est longue et difficile à mettre en oeuvre, elle n'est pas utilisable partout en routine car elle nécessite un matériel coûteux et ne peut être réalisée que par des personnels spécialisés. Néanmoins, elle permet de quantifier précisément les teneurs en acide okadaïque et/ou en DTX-1.

- **les tests immunochimiques utilisant des anticorps monoclonaux** : des trousse de dosage de l'acide okadaïque ont été proposées, ces méthodes donnent de bons résultats, mais doivent être validés. Cette technique présente deux inconvénients majeurs : i) un coût très élevé, surtout pour le traitement de nombreux échantillons dans le cadre d'un réseau de contrôle comme le REPHY ii) elle doit être utilisée dans un délai court (Levine *et al.*, 1988; Usagawa *et al.*, 1989; Shestowsky *et al.*, 1992; Tubaro *et al.*, 1992; Draisci *et al.*, 1994; Frémy *et al.*, 1994; Matura *et al.*, 1994).

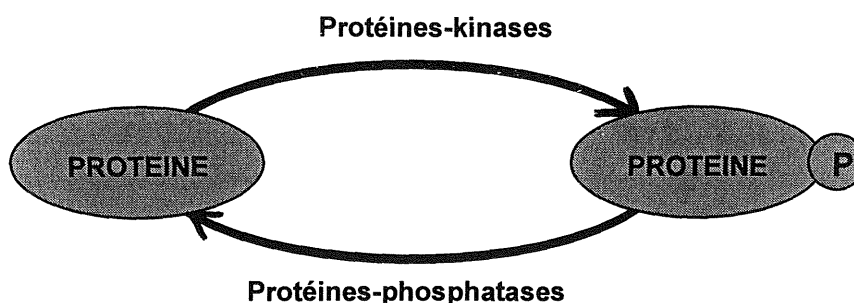
- **la méthode biochimique basée sur l'inhibition des protéines phosphatases par l'acide okadaïque** (Bialojan et Takai, 1988; Haystead *et al.*, 1989; Cohen, 1991). Elle est spécifique de la détection de l'acide okadaïque. Néanmoins, cette méthode est onéreuse car elle nécessite l'emploi de protéines phosphatases pures qui coûtent très cher. De plus les résultats obtenus jusqu'à présent à partir d'échantillons naturels ne sont pas reproductibles (Takai et Mieskes, 1991; Holmes, 1991; Simon, 1994).

- **les méthodes biologiques utilisant l'action de l'acide okadaïque sur les cellules** : ces techniques basées sur l'action de l'acide okadaïque sur différentes lignées cellulaires sont intéressantes car relativement sensibles et spécifiques. Toutefois, soit le choix de la lignée cellulaire et la méthode de détermination rendent ces méthodes plus ou moins accessibles, et toutes ne sont pas utilisables en routine (Yanagi *et al.*, 1989; Vandr  et Wills, 1992; Blay et Poon, 1995), soit la méthode nécessite à chaque fois le sacrifice d'animaux pour établir la culture cellulaire comme c'est le cas pour les hépatocytes de rat fraîchement préparés (Aune, 1989; Aune *et al.*, 1991; Rogers *et al.*, 1994).

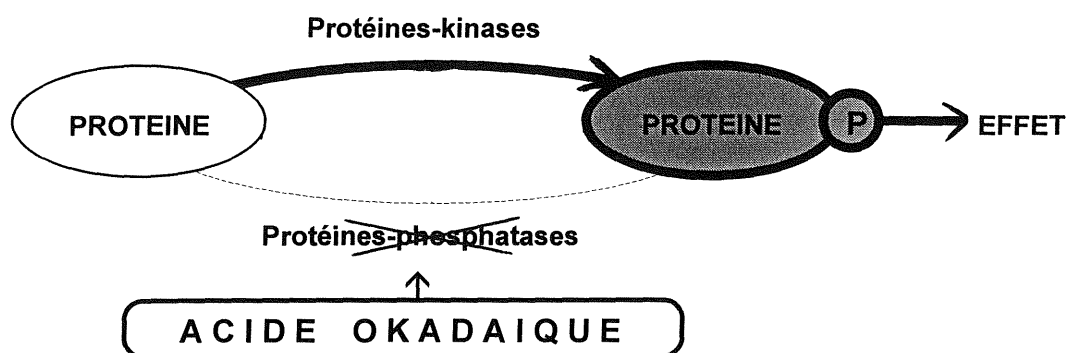
III. Cytodétection des phycotoxines diarrhéiques sur cellules KB

III. 1. L'acide okadaïque : un inhibiteur des protéines phosphatases

L'acide okadaïque agit au niveau cellulaire en inhibant les protéines-phosphatases, enzymes provoquant la déphosphorylation des protéines phosphorylées par les protéines-kinases. Il se produit donc une accumulation des protéines phosphorylées comme le montre le schéma ci-dessous.



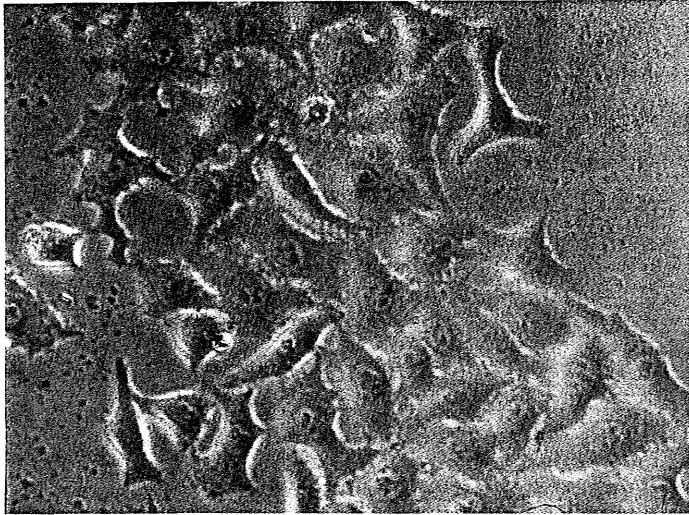
Fonctionnement normal du système PROTEINE-KINASES/PROTEINE-PHOSPHATASES



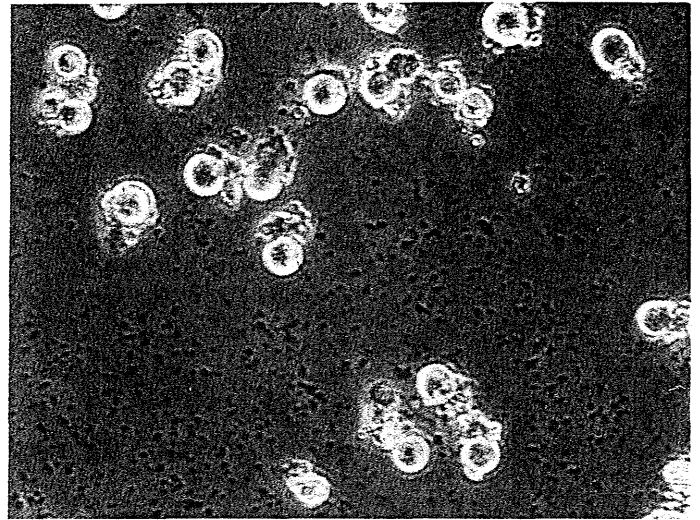
Modifications en présence d'acide okadaïque

Ces enzymes interviennent à de nombreux niveaux dans l'organisme d'où les différents effets recensés pour l'acide okadaïque. Un des plus spectaculaires est la rapide transformation de la morphologie des cellules à son contact due à son action sur la phosphorylation des protéines contrôlant cette morphologie.

Les photographies ci-dessous montrent les transformations obtenues avec les cellules de la lignée KB (cellules de type épithélial provenant d'un carcinome humain).



cellules KB normales (x 250)



cellules KB transformées par le contact avec l'acide okadaïque (x250)

C'est ce phénomène que nous avons utilisé pour la mise au point d'un nouveau test spécifique de détection des phycotoxines diarrhéiques de type acide okadaïque (AO).

Avant de voir comment l'on peut utiliser ce phénomène pour détecter l'AO, nous allons rappeler ce qu'est la lignée KB, comment elle se manipule et quels sont les effets sur elle de l'AO à des doses proches de la CI_{50} (Concentration inhibant 50 % de croissance cellulaire).

Les cellules KB

Ce sont des cellules d'un carcinome humain du rhinopharynx prélevées en 1954 sur une femme dont les initiales étaient K.B. (Eagle, 1955).

la lignée cellulaire KB se développe *in vitro* en formant une monocouche cellulaire adhérente. Les cellules mortes se décollent et passent en suspension dans le milieu de culture. Elles peuvent alors être éliminées par remplacement de ce milieu.

Entretien de la lignée KB

In vitro, la lignée KB se développe dans une solution nutritive BME (milieu de base "Eagle") contenant des sels minéraux, des acides aminés, des sucres et des vitamines.

Ce milieu est complété par 10 % de sérum de veau foetal, 1 % d'une solution d'antibiotiques (pénicilline 10 000 UI et streptomycine 10 000 µg/ml) et 1 % d'une solution de L-glutamine (200 mM).

Comme les cellules KB se développent en couche monocellulaire adhérente, leur repiquage est réalisé après une trypsination qui permet de les décoller de la paroi du flacon et de les séparer les unes des autres. Ainsi elles sont mises en suspension et après comptage et répartition, elles peuvent de nouveau se fixer et se multiplier.

Réalisation de la trypsination

Le flacon contenant la lignée cellulaire KB en monocouche adhérente est vidé de son milieu de culture éliminant ainsi le milieu usagé mais aussi les cellules mortes en suspension. 3 ml de trypsine sont ajoutés pour un flacon de 25 ml et laissés en contact des cellules pendant 1 min, puis jetés. La fine couche de trypsine restante est laissée en contact avec les cellules pendant environ 10 min, afin de décoller les cellules et de les séparer les unes des autres.

5 ml de milieu de culture BME sont ajoutés pour arrêter l'action de la trypsine par dilution. Les cellules en amas ou encore fixées à la paroi sont séparées par aspirations et rejets du milieu dans le flacon grâce à une pipette automatique. Ainsi une suspension cellulaire est obtenue. Après comptage, un repiquage est réalisé dans d'autres flacons avec des quantités connues de cellules.

En entretien, cette même opération est effectuée lorsque la croissance cellulaire arrive en phase stationnaire.

Numération des cellules

Dans un tube à essai, on met quelques microlitres de suspension cellulaire (4 gouttes) et un même volume de bleu Trypan qui colore les cellules mortes en bleu. Un petit volume de ce mélange est déposé sur une cellule de Malassez puis un comptage est réalisé au microscope.

III. 2. Cinétique de l'action de l'acide okadaïque sur les cellules KB

Afin de visualiser l'action de l'AO sur les cellules KB en culture en fonction du temps d'incubation, nous avons réalisé une cinétique de croissance des cellules en présence de différentes concentrations d'AO.

Une cinétique est réalisée après la détermination de la CI_{50} d'un produit. Le but est d'établir des courbes de croissance des cellules en fonction du temps d'incubation et des concentrations d'AO.

Méthodologie

Le jour du test, quatre concentrations d'AO sont préparées qui doivent encadrer sa CI_{50} (4 ng/ml) : 0, 1-2-10 et 20 ng/ml.

Six plaques microtests sont préparées et lues à des temps d'incubation différents :

- une plaque 0h : témoin à $t = 0$ en absence d'AO.
- une plaque 5h : lecture à 5 heures, permet de contrôler que les cellules sont en phase exponentielle de croissance.
- une plaque pour chacun des témoins des temps de lecture (24, 48, 72 et 96 heures).

La préparation des plaques suit la technique classique utilisée pour les cultures de cellules KB en vue de la détermination de la CI_{50} .

Après incubation, la croissance cellulaire est évaluée par dosage colorimétrique. Il est basé sur l'activité des déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes qui réduisent en Formazan (cristaux violacés) le M.T.T. [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium] (Mossman, 1983). Cette technique simple à mettre en oeuvre peut néanmoins donner des résultats entachés d'erreur si l'on est en présence d'une substance modifiant le métabolisme mitochondrial ou réduisant directement le M.T.T.

Résultats

La figure 1 regroupe les courbes de croissance des cellules KB en fonction du temps d'incubation et des concentrations d'acide okadaïque.

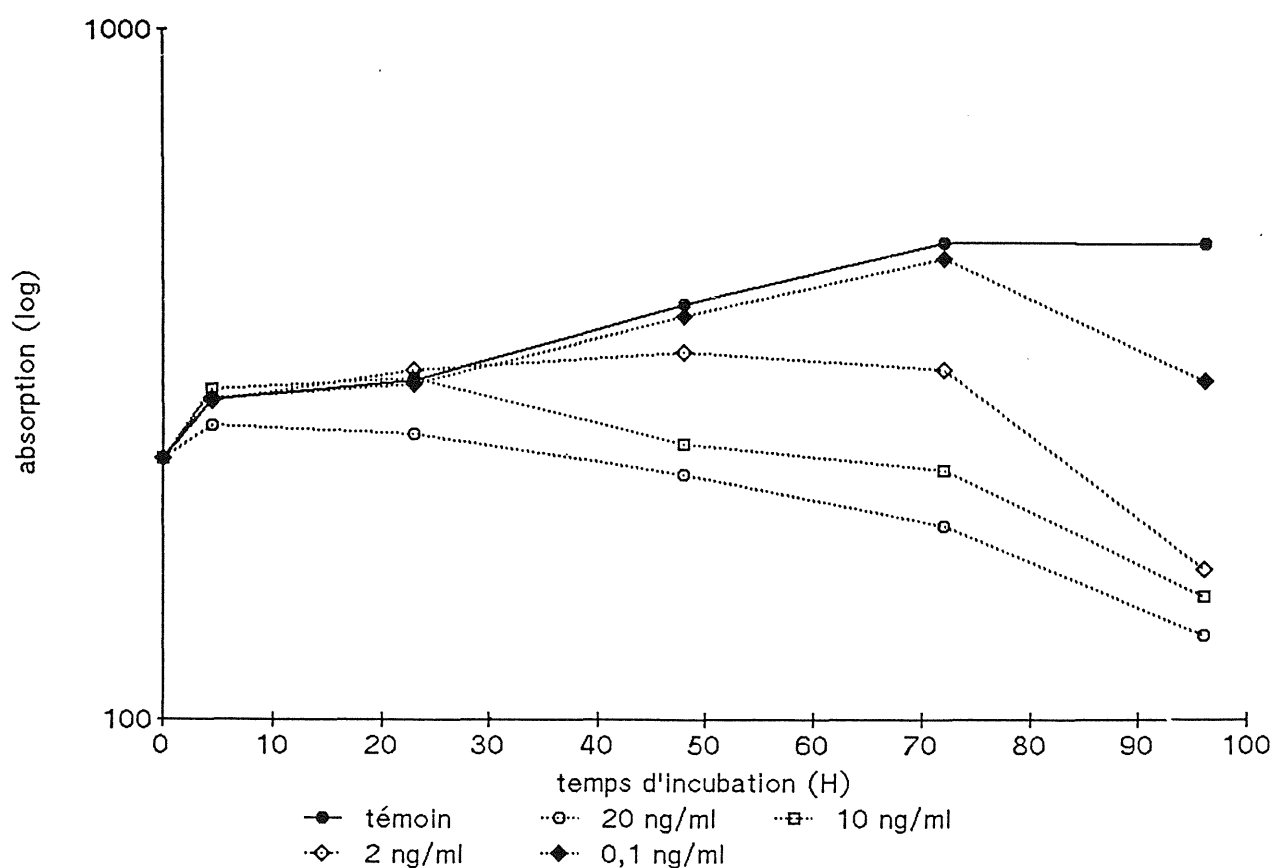


Figure 1 : Cinétiques de croissance de cultures de cellules KB en présence de différentes concentrations d'acide okadaïque.

Sur l'axe des abscisses, se trouve le temps d'incubation en heures. Les points de courbes se situent aux temps 0h, 4h30, 23h, 48h, 72h et 96h.

Sur l'axe des ordonnées, se trouve l'absorption exprimée en échelle logarithmique qui est proportionnelle à la croissance cellulaire.

Discussion

La courbe du témoin croît régulièrement en fonction du temps démontrant de ce fait que la culture est bien en phase exponentielle de croissance.

L'activité cytotoxique nette (diminution du nombre de cellules vivantes) est parfaitement visualisée sur ces courbes. Elle apparaît d'autant plus tard que la concentration testée est faible.

En fait, si la CI_{50} de l'acide okadaïque est très faible (3 ng/ml), prouvant la grande sensibilité de la méthode de détection, elle nécessite un temps très long (72 heures) pour sa détermination non compatible avec une utilisation en contrôle de routine. Par contre les changements morphologiques sont observables très rapidement (quelques heures) mais pour des concentrations plus forte en AO. Afin d'utiliser ce phénomène, nous avons développé une nouvelle technique de détection biologique de l'AO.

III. 3. Méthode développée

Principe

Le point principal à développer était le mode de lecture des résultats. Comme il était nécessaire de posséder une valeur chiffrée pour estimer le taux de contamination des coquillages, et ne pouvant pas utiliser la méthode colorimétrique classique, nous avons développé une méthode originale dans le domaine des tests sur cultures cellulaires : la détermination de la **Concentration Minimale Active (CMA)** : concentration minimale qui induit un changement visible de la morphologie des cellules.

Pour cela, nous avons utilisé un protocole semblable à celui des déterminations des CMI et CMB en bactériologie (concentrations minimales inhibitrices et bactéricides), en testant une gamme de concentrations en progression géométrique d'ordre 1/2. Nous avons ainsi mis en contact cette gamme de dilutions d'extraits avec des cellules. Après un temps d'incubation suffisant, nous avons recherché la première concentration (en partant de la plus faible) qui provoquait un changement d'aspect de la culture par rapport au témoin.

Avant l'étude de validation de cette nouvelle méthode de détection biologique, nous allons développer en détail son protocole opératoire.

Préparation des extraits

La méthode débute par une extraction des hépatopancreas (50g) des moules par le mélange méthanol-eau 90 : 10 (3 x 50 ml) suivie d'un partage liquide-liquide avec de l'hexane (3 x 60 ml) afin d'éliminer tout les produits apolaires indésirables. La polarité de la phase méthanolique est augmentée par addition d'eau pour obtenir un mélange méthanol-eau 70 : 30, puis elle est extraite par le dichlorométhane par une opération de partage (3 x 60 ml). La fraction chlorométhylénique évaporée à sec et pesée sert d'extrait pour la recherche des phycotoxines diarrhéiques (figure 2).

Préparation des dilutions d'extrait

Dans le but de déterminer la CMA d'un extrait sur les cultures cellulaires, nous avons testé une gamme de concentrations, suffisamment étendue (de 4 à 64 $\mu\text{g/ml}$) permettant de détecter avec une bonne sécurité les extraits contaminés préparés par dilutions successives au 1/2 d'une solution mère.

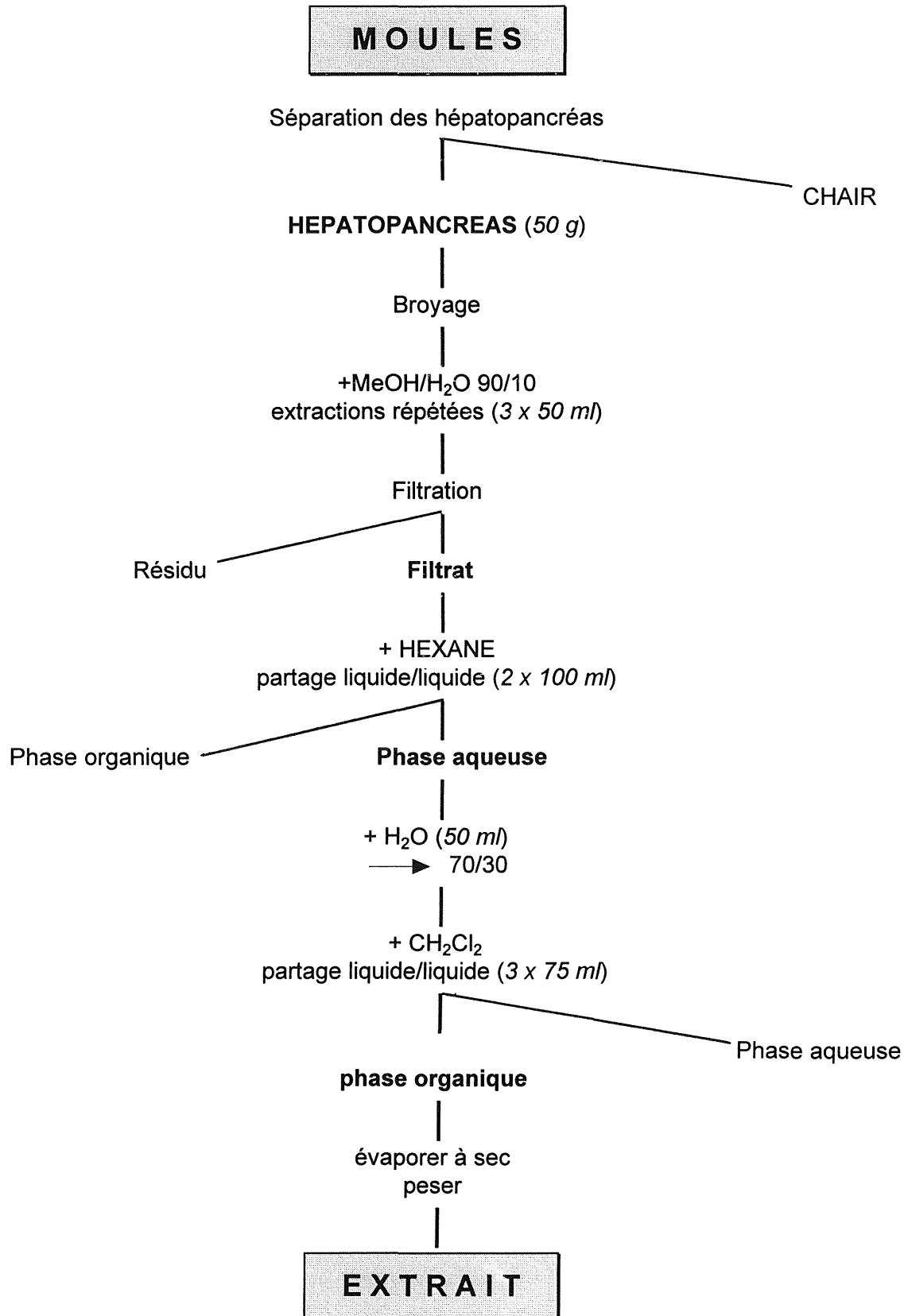


Figure 2 : Méthode retenue pour la préparation des extraits de moules en vue de la recherche des toxines de type de l'acide okadaïque.

Lors de l'incorporation, 50 µl de chacune des solutions sont ajoutés aux 50 µl de suspensions cellulaires déjà contenues dans le puits. Ceci entraîne une dilution de moitié de la concentration dont il faut tenir compte pour la préparation de la gamme. Donc, afin de tester la gamme prédéfinie (4 à 64 µg/ml), il convient donc de préparer des solutions deux fois plus concentrées allant de 8 à 128 µg d'extrait par ml. Ceci est réalisé à partir d'une solution mère de l'extrait dans du milieu physiologique stérile, par dilutions successives avec ce même solvant.

Préparation des plaques de test

Les tests sont réalisés dans des plaques microtests à 96 puits (12 colonnes et 8 rangées). Comme l'incorporation des extraits à tester doit être effectuée sur des cellules en phase exponentielle de croissance, il est donc indispensable de préparer par la technique de trypsination une suspension cellulaire de 200.000 cellules par ml la veille du test. 50 µl de cette suspension cellulaire sont mis dans chaque puits et 100 µl dans les puits témoins.

Les plaques sont mises dans un incubateur à CO₂ (air-gaz carbonique : 95-5 %) à 37°C jusqu'au moment du test, moment de l'incorporation des extraits d'hépatopancréas de moules à tester. Ainsi, les cellules seront en phase exponentielle de croissance 24 heures plus tard, pour la réalisation du test proprement dit.

Incorporation des extraits

L'incorporation des extraits à tester est réalisée dans la plaque microtest contenant les cellules KB préparées la veille. 50 µl de chacune des dilutions préparées sont ajoutés au puits correspondant (1 colonne = 1 extrait, 1 ligne = 1 concentration), chaque extrait est testé en double. Les plaques sont ensuite mises dans un incubateur à CO₂ à 37°C.

Lecture des plaques : détermination de la C.M.A.

La détermination de la C.M.A. se fait **par lecture directe de la morphologie des cellules en culture au microscope sans coloration préalable** ce qui permet un gain de temps appréciable. En effet, il existe une grande différence morphologique entre les cellules témoins et les cellules traitées avec un extrait toxique.

Dans l'état normal, les cellules KB présentent un aspect épithélial avec des espaces intercellulaires. Les cellules, ayant subi l'action toxique de l'acide okadaïque, s'arrondissent.

Ces deux types d'aspects cellulaires peuvent se retrouver ensemble dans une culture si la dose de toxine n'est pas assez forte pour transformer toutes les cellules.

La détermination de la CMA se fait selon le protocole décrit par la figure 3 : nous recherchons, en commençant par les concentrations les plus faibles, la première cupule dont l'aspect diffère nettement de celui de la culture témoin par la présence de cellules rondes nombreuses (au moins 30 %).

Il faut noter que cette méthode peut paraître aléatoire dans sa lecture et demander des personnes très exercées à l'observation des cultures cellulaires. Or, il n'en est rien : en effet, nous avons, à diverses reprises, fait lire les résultats du test, sans concertation, à différents membres du laboratoire habitués ou non à ce type d'examen microscopiques. A chaque fois, les résultats se sont avérés identiques pour tous les extraits pour toutes ces personnes.

Calcul de la CMA

La CMA lue est exprimée en poids d'extrait par ml de culture. Or suivant la façon de préparer les extraits, la richesse plus ou moins importante en sels minéraux ou en corps liposolubles dans les hépatopancréas des moules, les rendements d'extraction peuvent varier dans des proportions significatives.

C'est pourquoi, afin de rendre les résultats comparables en éliminant les facteurs de variation nous rapportons la C.M.A. en poids d'hépatopancréas (HP) par ml de culture selon le calcul suivant.

$$CMA_{HP} \text{ (en mg HP/ml)} = CMA_{lue} \text{ (}\mu\text{g/ml)} \cdot \text{poids}_{HP} \text{ (g)} / \text{poids}_{EXTR} \text{ (mg)}$$

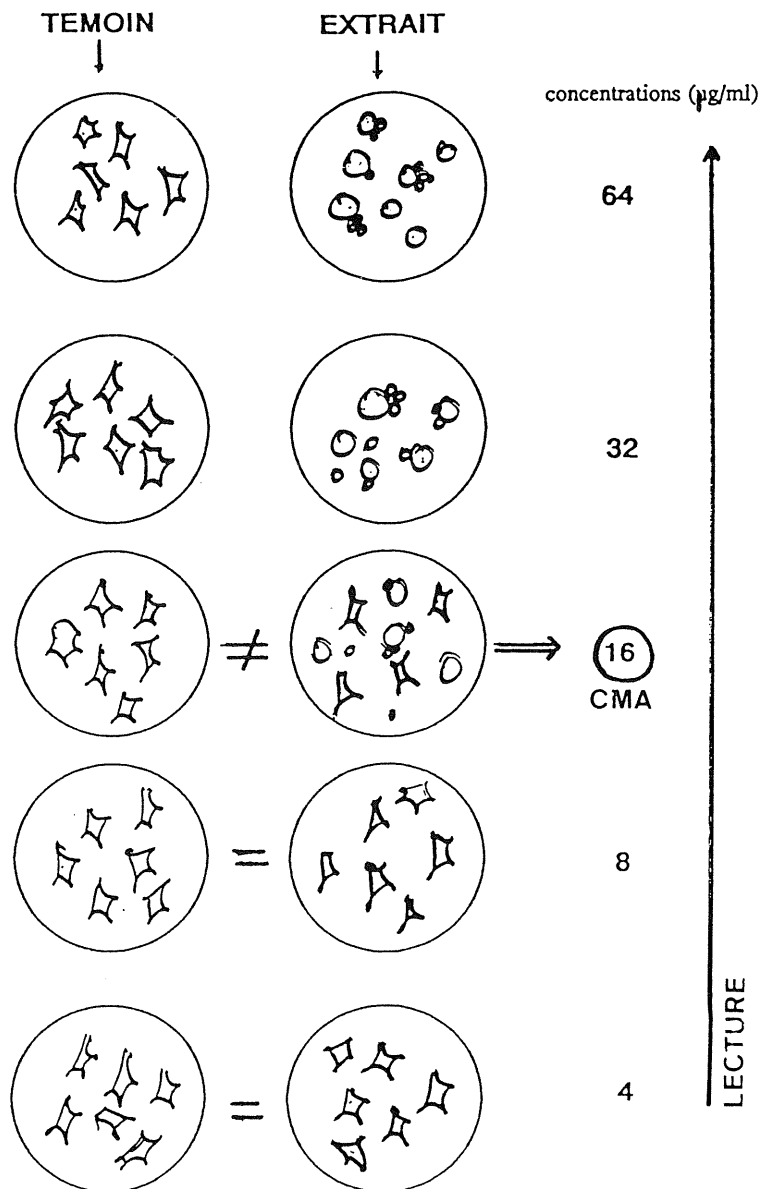


Figure 3 : Schéma de principe de la détermination de la CMA

rechercher le premier puits (en partant des faibles concentrations) qui contient à la fois des cellules normales et des cellules transformées en nombre suffisant pour donner un aspect différent de celui de la culture témoin.

Détermination du temps d'incubation optimal

Pour déterminer la durée optimale d'incubation, c'est à dire le temps au bout duquel nous pouvons faire une évaluation de la CMA avec une stabilité de la mesure, nous avons réalisé une étude sur 16 échantillons d'extraits de moules toxiques ou non, testés quatre fois chacun dans la gamme de concentration définie.

La lecture de la CMA a été effectuée ensuite 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8 heures après l'incorporation des extraits. La variation entre deux lectures consécutives a été étudiée pour chaque extrait : pour tous les échantillons, les CMA évoluent au cours du temps mais un plateau entre la troisième et la quatrième heure indique une stabilité temporaire de l'aspect des cellules. Cette période de stabilité permet une lecture des plaques dans de bonnes conditions. La durée optimale d'incubation retenue pour la détermination de la CMA est donc comprise entre 3 et 4 heures.

III. 4. Validation de la méthode

III. 4. 1. Reproductibilité

Une étude de la reproductibilité de l'évaluation de la CMA a été menée sur 21 échantillons d'extraits de moules toxiques ou non. La CMA a été mesurée pour chacun de ces échantillons quatre fois à des jours différents. Les résultats de ces mesures sont donnés dans le tableau 1.

Extraits	Mesures des CMA (µg/ml)				Nombre de mesures identiques	
	1ère	2ème	3ème	4ème		%
I	16	16	8	16	3	75
II	8	8	8	8	4	100
III	16	16	16	16	4	100
IV	16	16	16	16	4	100
V	8	8	8	8	4	100
VI	32	16	16	16	3	75
VII	32	32	16	32	3	75
VIII	16	16	8	16	3	75
IX	32	32	32	32	4	100
X	16	8	8	16	2	50
XI	64	64	64	64	4	100
XII	64	32	32	32	3	75
XIII	32	32	32	32	4	100
XIV	64	64	64	64	4	100
XV	>64	>64	>64	>64	4	100
XVI	>64	>64	>64	>64	4	100
XVII	>64	>64	>64	>64	4	100
XVIII	>64	>64	>64	>64	4	100
XIX	8	8	8	8	4	100
XX	>64	>64	>64	>64	4	100
XXI	>64	>64	>64	>64	4	100

Tableau 1 : étude de reproductibilité de la CMA

15 échantillons sur 21 (71,5 %) donnent des résultats identiques les quatre fois. 4 sur 21 (19 %) donnent 3 CMA identiques et la quatrième ne diffère seulement que d'une dilution (facteur 2). Pour un seul échantillon, les lectures sont réparties par moitié sur deux valeurs consécutives.

Cette méthode est donc très reproductible puisque dans plus de 90 % des cas (71,5 + 19), sur quatre déterminations différentes, au moins trois sont identiques, la quatrième ne variant éventuellement que d'une dilution, ce qui est très satisfaisant pour une méthode biologique.

III.4.2. Sensibilité

La limite de détection de la méthode a été déterminée avec un standard d'acide okadaïque fourni par Diagnostic Chemicals Limited (Charlottetown, P.E.I., Canada C1E 180). La gamme de concentrations testée allait de 1 à 0,0008 µg AO/ml par dilution au 1/2. L'expérience a été répétée 4 fois à des jours différents en donnant à chaque fois une valeur de CMA de 0,125 µg AO/ml de milieu de culture.

Comme le volume total de la culture cellulaire dans le puits est de 100 µl, la quantité minimale détectable d'acide okadaïque correspondante est donc de 0,0125 µg soit 0,05 Unité-Souris (au sens de l'US définie par Yasumoto en 1978 : 1 US = 4 µg d'AO). Ce test est donc beaucoup plus sensible que le test-souris.

III.4.3. Corrélation entre la CMA et la concentration en acide okadaïque

Une étude de corrélation a été réalisée entre les CMA et les concentrations d'acide okadaïque, dans les hépatopancréas, déterminées par analyse physico-chimique : CLHP/ spectrofluorimétrie après dérivation avec l'ADAM, sur 11 extraits d'hépatopancréas de moules dont 9 sont toxiques.

Extrait	Poids HP g	Poids EXT mg	AO par CLHP µgAO/gHP	CMAEXT µgEXT/ml	CMA _{HP} mgHP/ml
I	36	19	ND	NT	-
II	28	16	ND	NT	-
III	50	63,6	2,6	32	25,4
IV	12,2	10,7	2,6	16	18,2
V	13	16	3,3	32	26
VI	10	5,4	3,4	8	14,8
VII	54	74	3,4	16	11,7
VIII	50	47	7,1	8	8,5
IX	30	81	7,1	16	5,9
X	22,3	35	7,4	8	5,1
XI	5	8,8	16	8	4,5

HP = Hépatopancréas, EXT = extrait, AO = acide okadaïque

ND = non détectable, NT = non toxique à la dose maximale testée

Tableau 2 : étude comparative des concentrations en acide okadaïque déterminées par CLHP et les CMA des extraits d'hépatopancréas de moules correspondants

Le tableau 2 donne pour les 11 extraits préparés pour cette étude, les poids d'hépatopancréas prélevés, les poids des extraits obtenus, les concentrations en acide okadaïque dans les hépatopancréas déterminées par dosage CLHP et enfin les CMA exprimées en poids d'extraits (valeur lue) ou d'hépatopancréas (valeur calculée) par unité de volume de culture.

9 des 11 extraits correspondaient à des moules toxiques fournies par le réseau de surveillance d'IFREMER, les 2 autres ont été préparés à partir d'échantillons du commerce donc théoriquement non toxiques puisqu'autorisés à la vente.

Ces résultats ont été confirmés par les mesures effectuées : il a été possible de déterminer une CMA et d'effectuer un dosage sur les 9 échantillons toxiques. Par contre, pour les 2 autres, aucun pic pouvant correspondre à de l'acide okadaïque n'a été détecté par CLHP et aucune CMA n'a pu être déterminée dans la gamme de concentrations testées.

Entre les CMA et les concentrations en AO des 9 échantillons toxiques (exprimés en logarithmes), il existe une relation linéaire avec un coefficient de corrélation $r = 0,90$. Il faut donc remarquer que malgré l'imprécision apparente de la méthode (facteur 2 déjà défini), la corrélation avec la concentration en AO est très bonne. De plus, cette corrélation peut être encore améliorée en prenant en compte les extraits non toxiques.

Pour cela, nous attribuons arbitrairement des valeurs pour les CMA et le dosage CLHP correspondant à : 0,2 ng pour la CLHP (limite de détection divisée par 2) et 128 µg/ml pour la CMA (2 fois la valeur maximale testée). Dans ce cas, le coefficient de corrélation entre les logarithmes des CMA_{HP} et des C_{CLHP} passe à " $r = 0,98$ ", ce qui prouve l'intérêt de cette méthode pour la détection des phycotoxines diarrhéiques de type AO.

III.4.4. Spécificité

Afin de mettre en évidence la spécificité du test basé sur l'observation des changements morphologiques de cellules pour la détection des toxines de type acide okadaïque, nous avons testé une gamme de phycotoxines marines (pures ou contenues dans des extraits de coquillages contaminés) conduisent tous à une positivité du test de toxicité aiguë sur souris ainsi que d'autres toxines ayant des mécanismes d'action voisins de celui de l'acide okadaïque.

La concentration maximale testée pour chaque échantillon était de 1 µg/ml. Pour chaque substance active, nous avons déterminé sa CMA, les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 3.

Echantillon	Type de toxicité	mécanisme d'action	CMA ng/ml
Acide okadaïque	DSP	IPP lipo.	125
DTX1	DSP	IPP lipo.	16
DTX2	DSP	IPP lipo.	90
Extraits moules DSP	DSP	IPP lipo.	+
Calyculine A		IPP lipo.	5
Microcystine-LR	hépatotoxique	IPP hydro	inactif
Acide domoïque	ASP		inactif
Extraits moules PSP	PSP		inactif
Extraits moules toxiques	?		inactif

IPP : inhibiteur de protéines phosphatase; lipo = lipophile
hydro = hydrophile ; + : CMA déterminable

Tableau 3 : détermination de la CMA de différentes toxines marines et d'extraits de coquillages contaminés

La première constatation s'imposant à la vue de ces résultats est que le test de cytodétection sur cellules KB est moins "généraliste" que le test souris. En effet, seul un nombre restreint des toxines testées conduit à une positivité du résultat.

Le point commun des toxines "DRAME-positives" est qu'elles sont toutes des inhibiteurs des protéines phosphatases. Un résultat positif à ce test est basé sur l'observation de la modification de la morphologie des cellules qui s'arrondissent sous l'effet des toxines. De tels changements morphologiques sont bien connus et ont été observés sur de nombreuses lignées cellulaires. Ainsi, l'acide okadaïque produit une altération dans l'organisation du cytosquelette, associée à l'arrêt mitotique, caractérisée par une condensation et un éparpillement des chromosomes (formation du fuseau) (Gavin *et al.*, 1991; Zheng *et al.*, 1991; Ishida *et al.*, 1992; Vandr  *et Wills*, 1992).

Ainsi, l'effet de l'AO à des faibles concentrations (2-40 nM) sur la lignée LLC-PK provoque un blocage principalement en phase G2/M ( tape métaphase de la mitose) au bout de 6 à 8 heures de contact. Cependant, les cellules continuent à entrer dans le cycle pendant au moins 24 heures, ce qui montre qu'à ces concentrations, l'AO n'est pas cytotoxique mais plutôt cyostatique réversible. Ce blocage de la mitose provoqué par l'AO est probablement d  à l'inhibition des protéines phosphatases 2A qui sont impliquées dans la transition métaphase/anaphase.   plus fortes concentrations (0,5 - 1 M), ce blocage apparaît entre 30 et 60 min après mise en contact, alors qu'entre 90 et 120 min les cellules deviennent rondes et se détachent de la monocouche cellulaire, ce phénomène étant irréversible.

Sur les lignées humaines HL-60 et U937 (leucémies my lo ides), 2 à 8 nM d'AO pendant 24 - 48 heures provoque un arrêt en G2/M (début de la mitose). La viabilité des cellules diminue rapidement après 48 heures de traitement avec un changement de la morphologie des cellules (Ishida *et al.*, 1992).

Les cinq toxines testées qui donnent un résultat positif, l'AO et ses dérivés et la calyculine A, ont toutes en commun d'être des inhibiteurs des protéines phosphatases de polarités moyennes. Il existe en fait un lien direct entre cette activité inhibitrice et les changements morphologiques des cellul s. En effet, du fait de l'inhibition de ces enzymes, les protéines du cytosquelette qui sont naturellement phosphorylées par les protéines kinases, ne peuvent plus être d phosphoryl es et donc s'accumulent dans cette forme provoquant des modifications de la conformation cellulaire.

Ainsi, Kasahara *et al.* (1993) ont montré que les changements morphologiques de kératinocytes induits par l'acide okadaïque provenaient de l'hyperphosphorylation des filaments de kératine, et à la réorganisation du réseau de filaments entraînant un arrondissement des cellules. L'altération par l'AO de la cytokératine du cytosquelette d'hépatocytes de rat a également été soulignée par Blankson *et al.* (1995). Arias *et al.* (1993) ont de la même façon montré sur des neurones que la phosphorylation des protéines associées aux microtubules affectait la structure du cytosquelette. Kawakami *et al.* (1994) ont pu mettre en évidence que les changements morphologiques induits par l'AO sur des plaquettes sanguines provenaient de la phosphorylation des chaînes 20 kDa de myosine. Enfin, Diogène *et al.* (1995) ont attribué l'arrondissement des fibroblastes provoqué par l'AO, à la réduction en nombre et en taille des filaments de F-actine cytoplasmique et au raccourcissement des fibres périphériques.

La différence importante de CMA constatée entre l'AO et la calyculine A, est équivalente à celle décrite par Sakurada *et al.* (1992) lors de leur étude comparative menée sur différentes lignées cellulaires humaines. De plus, lors d'une étude directe des activités

de ces toxines sur les protéines phosphatases, Suganuma *et al.* (1992) ont montré une forte différence d'activité entre la calyculine A et l'AO sur la PP1 (CI₅₀ respectives 3,4 et 0,3 nM). Par contre ces deux toxines possédaient des activités voisines vis-à-vis de la PP2A (CI₅₀ : 0,13 et 0,07 nM). Honkanen *et al.* (1994) ont donné des valeurs légèrement différentes pour ces CI₅₀. Néanmoins les ordres de grandeur restent semblables.

Le fait que dans le cas du test étudié, le rapport des CMA de ces toxines soit plus proche de celui de leurs CI₅₀ sur la PP1 que celui sur la PP2A, peut faire penser que c'est cette première enzyme qui est principalement impliquée dans le processus de modification morphologique dans le cas des cellules KB. Il est également intéressant de constater que si les activités sur ce test de l'AO et de la DTX2 sont voisines, la DTX1 est par contre plus active et sa limite de détection est plus basse que pour les deux autres toxines.

La microcystine-LR, bien qu'inhibiteur de ces mêmes protéines phosphatases ne donne pas une réponse positive contrairement à ce que l'on aurait pu attendre. En fait, celle-ci, contrairement à l'AO et à la calyculine A, est de nature peptidique et donc hydrophile, et il semble que seuls les hépatocytes possèdent les récepteurs nécessaires à sa pénétration rapide. C'est ce qui expliquerait d'ailleurs pourquoi cette toxine est purement hépatotoxique (Honkanen *et al.*, 1990; Carmichael *et al.*, 1992).

D'ailleurs Boee *et al.* (1991) ont montré sur différentes lignées cellulaires le même effet de modification de la morphologie sous l'action de l'acide okadaïque et de la calyculine A, par contre, il n'a décrit ce phénomène pour la microcystine que sur les hépatocytes fraîchement préparés. Ce phénomène d'inactivité apparente de la microcystine ayant été également constaté par Henning *et al.* (1992). De la même façon, le pouvoir de différenciation des inhibiteurs des protéines phosphatases a été montré sur des cellules tumorales, à condition toutefois que ceux-ci pénètrent dans la cellule (Kiguschi *et al.* 1992).

L'inactivité relative de la microcystine-LR serait donc due à un défaut de pénétration dans les cellules KB. En fait Khan *et ses collaborateurs* (1995) ont montré que pour obtenir un effet de la microcystine-LR sur des fibroblastes ou sur des cellules rénales, il fallait utiliser des doses 10 fois supérieures à celles nécessaires pour la transformation des hépatocytes par cette toxine, et laisser incuber l'ensemble jusqu'à 24 heures alors que sur les cellules hépatiques 1/2 heure est suffisante pour obtenir le même effet. Ceci confirmerait que l'apparente inactivité de la microcystine-LR proviendrait d'un défaut de pénétration dans les cellules non hépatiques. Ceci a été également confirmé par Matsushima *et ses collaborateurs* (1990) : la microinjection de la microcystine dans les fibroblastes humains induit des changements morphologiques qui ne sont pas obtenus par un simple contact.

Les changements morphologiques étant engendrés par l'inhibition des protéines phosphatases, il était logique que les autres toxines testées qui ne possèdent pas ce type d'activité, donnent un résultat négatif à ce test. C'est le cas de l'acide domoïque et de l'extrait de moules contaminées par des toxines paralysantes (PSP) qui contenaient principalement des gonyautoxines (GTX2 et GTX3).

L'ensemble de ces données permet donc de penser que le test DRAME est spécifique, non pas de l'acide okadaïque, mais des inhibiteurs des protéines phosphatases de type acide okadaïque.

III.5. Conclusion

La cytotoxicité à court terme d'extraits de moules toxiques sur cultures cellulaires KB est une méthode particulièrement bien adaptée pour la détection de contaminations par l'acide okadaïque.

Elle possède une bonne sensibilité vis-à-vis de cette toxine puisque la limite de détection mesurée est de 0,0125 µg d'AO, ce qui correspond à 0,05 Unité Souris (US).

L'avantage de cette technique est qu'elle peut-être entièrement réalisée dans la journée. En effet, les extraits sont préparés le matin, incorporés en fin de matinée et la lecture des résultats se fait dans l'après midi (figure 4).

La lignée cellulaire KB utilisée présente plusieurs avantages : elle est de culture relativement aisée, elle est très stable dans le temps (Shoemaker, 1983). Elle permet également une lecture directe au microscope sans coloration au préalable du fait des différences morphologiques importantes entre les cellules saines et celles transformées par l'effet toxique.

Enfin, ce test s'applique à la détection de contaminations de coquillages par des algues produisant l'acide okadaïque et ses dérivés. Il permettra d'éliminer de nombreux "faux-positifs", du fait de sa grande spécificité vis-à-vis des inhibiteurs des protéines phosphatases du type AO.

C'est pourquoi cette technique a été retenue par l'IFREMER afin de la tester dans les laboratoires côtiers pour qu'elle puisse remplacer à court terme le test souris utilisé dans le cadre du REPHY.

L'étude proposée correspond donc à un essai de mise en place, dans des conditions réelles d'utilisation, de cette méthode de cytodétection de l'acide okadaïque dans les coquillages contaminés.

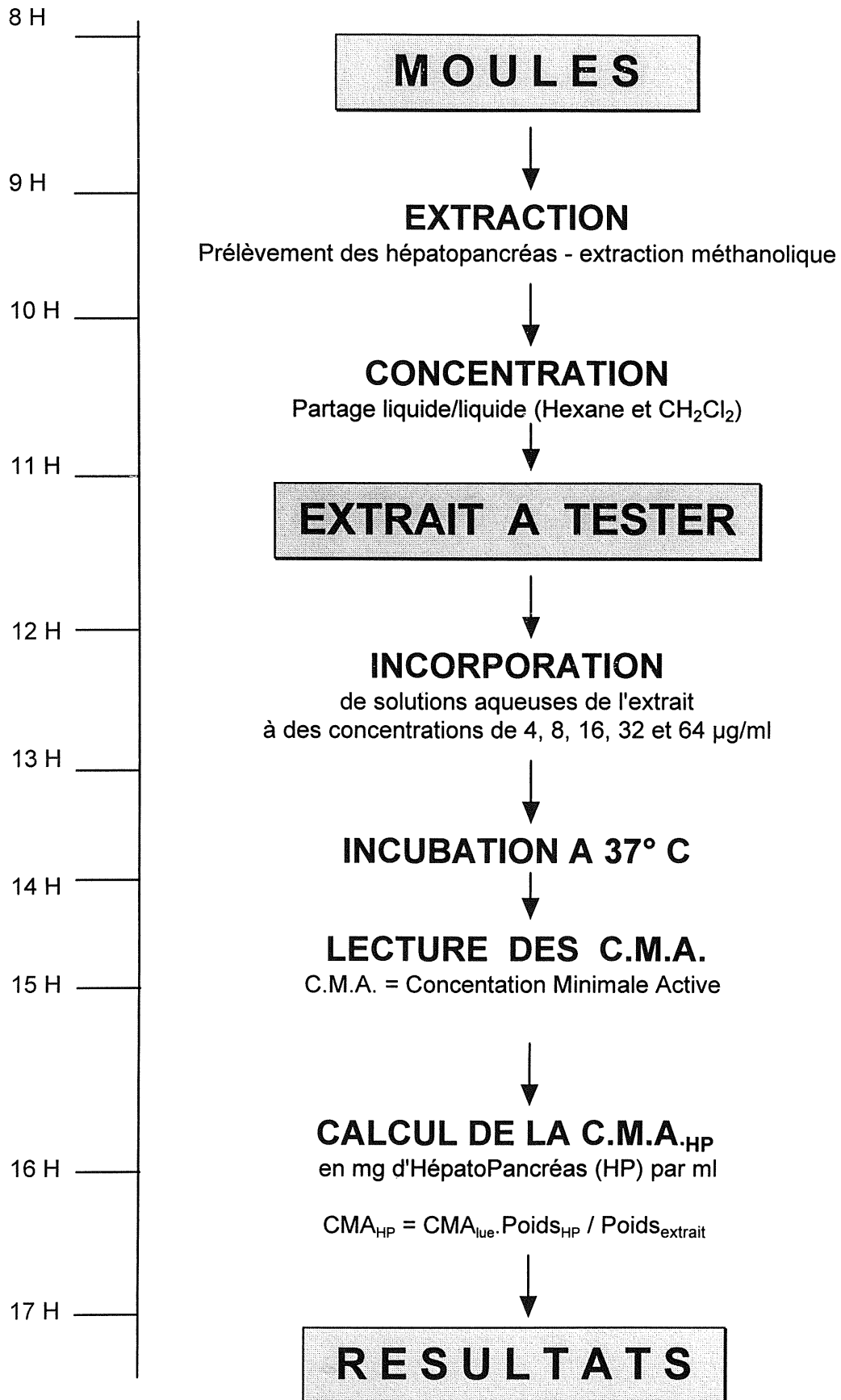


Figure 4 : Chronologie de réalisation du test dans la journée.

IV. Etude pilote du test de cytodétection des toxines diarrhéiques

Ce test est aujourd'hui parfaitement fonctionnel. A la suite d'une formation des personnels des laboratoires côtiers, une première étude de développement en laboratoire côtier a été menée à Concarneau.

Des remarques d'ordre pratique exposées à la suite de ce protocole nous ont conduit à proposer une étude d'amélioration du test. Tout d'abord, il faudrait simplifier la technique d'extraction qui fait appel à une prépurification par partages liquide/liquide successifs. Cette méthode est très performante mais relativement longue à mettre en oeuvre, surtout lorsqu'il faut traiter plusieurs échantillons à la suite. Le deuxième point à étudier concerne les cultures cellulaires : les laboratoires côtiers chargés de la surveillance ont une charge de travail importante et l'entretien régulier de la lignée cellulaire KB vient en surcroît de cette charge. Il serait donc intéressant d'étudier la possibilité de préparer des cultures cellulaires "prêtes à l'emploi" en trousse qui seraient fournies aux laboratoires utilisateurs par un laboratoire central. Nous proposons donc l'étude ci-dessous.

➤ Simplification de la technique

Simplification du protocole d'extraction des coquillages à tester

La détection étant basée sur une propriété spécifique des toxines recherchées (inhibition des protéines phosphatases cellulaires induisant des changements morphologiques), une extraction simplifiée des moules sans étape de prépurification devrait conduire au même résultat. Il conviendra toutefois de réajuster la gamme des doses testées aux nouveaux rendements d'extraction.

Simplification du protocole du test

Une diminution du nombre de dilutions testées pourrait faire gagner du temps pour les tests réalisés à partir de nombreux échantillons.

Mise au point de trousse à envoyer dans les laboratoires côtiers pour leur permettre de réaliser le test en les dispensant de l'entretien des cellules

La réalisation de trousse permettrait une simplification du travail des utilisateurs (entretien des lignées). Pour cela nous allons étudier la possibilité de l'envoi de cultures cellulaires depuis un laboratoire central producteur vers les laboratoires utilisateurs. Les conditions de transport des cellules devront être déterminées pour que celles-ci arrivent dans un état satisfaisant pour la réalisation du test.

Une étude de brevetabilité de trousse développés est à envisager.

➤ Etude de faisabilité dans le cadre réseau REPHY

Les modifications proposées seront testées sur deux saisons de récolte entre un laboratoire central situé à Nantes et deux laboratoires côtiers de l'IFREMER chargés de la surveillance (Concarneau, Nantes).

Cette étude, si elle donne un résultat positif, servira de base pour réaliser un protocole de validation à plus grande échelle en association avec des équipes irlandaises et espagnoles.

Liste des intervenants :

Z. AMZIL, C. LE BAUT

Laboratoire Phycotoxines et Nuisances DEL/PN -IFREMER-Nantes

Dosages CLHP - mise au point des troussees - coordination interne IFREMER

Y.F. POUCHUS, D. MOREL

Groupe de recherche Substances Marines à Activité Biologique (SMAB)

URM 11, faculté de Pharmacie - Nantes

Simplification des techniques - production des cellules - mise au point des kits

Laboratoires côtiers : Concarneau et Nantes,

Etude de faisabilité du test

V. RECOMMANDATIONS

Les réseaux de surveillance, bien que lourds à gérer et coûteux en moyens, répondent non seulement à une priorité de santé publique mais aussi à une exigence de qualité. De plus, ils sont la source d'une information extrêmement riche. C'est pourquoi, il faudrait **renforcer les objectifs de qualité pour la partie analytique du REPHY** pour garantir la fiabilité des résultats. Pour cela, il serait utile de mettre en place une formation permanente du personnel aux nouvelles techniques et préparer un manuel des méthodes d'analyses chimique et biologique pour les différents types de phycotoxines connues. Il est également nécessaire de réaliser un exercice d'intercalibration des méthodes utilisées entre les différents laboratoires côtiers à partir des échantillons communs.

De plus, les laboratoires chargés de la surveillance devraient évoluer au même rythme que le progrès des connaissances et le développement de méthodes nouvelles et avec le soutien des laboratoires de recherches. Pour qu'un laboratoire soit crédible, il doit en effet prouver qu'il utilise du bon matériel, qu'il met en oeuvre des méthodes adaptées, avec du personnel formé et compétent dans des locaux conformes aux normes internationales.

La mise en place d'une nécessaire politique d'assurance de qualité passe par la centralisation des actions de formation des personnels en vue d'une homogénéisation des comportements. Elle devrait s'appuyer sur une équipe identifiée, servant d'interlocuteur vis à vis des laboratoires côtiers pour ce qui concerne la méthodologie. Ceci permettrait de donner des directives claires aux laboratoires d'application pour la gestion des épisodes à toxines atypiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AMZIL Z., POUCHUS Y.F., LE BOTERFF J., ROUSSAKIS C., VERBIST J.F., MARCAILLOU-LE BAUT C., MASSELIN P. (1992). **Short-time cytotoxicity of mussel extracts : A new bioassay for okadaic acid detection.** *Toxicol.*, 30 (1), 1419-1425.
- AMZIL Z. (1993). **Phycotoxines des efflorescences algales, l'acide okadaïque : optimisation de la purification - nouvelle méthode de détection biologique.** *Thèse de Doctorat de l'Université de Nantes, école doctorale Chimie-Biologie.*
- ARIAS C., SHARMA N., DAVIES P., SHAFIT-ZAGARDO B.J. (1993). **Okadaic acid induces early changes in microtubule-associated protein 2 and T-phosphorylation prior to neurodegeneration in cultured cortical neurons.** *J. Neurochem.*, 61 (2), 673-682.
- AUNE T. (1989). **Toxicity of marine and freshwater algal biotoxins towards freshly prepared hepatocytes.** In : *Mycotoxins and Phycotoxins'88. 7th Int. IUAPC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, 16-19 August 1988, Tokyo.* Natori S., Hashimoto K., Ueno K. Ed. Elsevier, Amsterdam, 461-468.
- AUNE T., YASUMOTO T., ENGELAND E., (1991). **Light and scanning electron microscopic studies on effects of marine algal toxins towards freshly prepared hepatocytes.** *J. Toxic. environ. Hlth* 34, 1-9.
- BLANKSON H., HOLEN I., SEGLEN P.O. (1995). **Disruption of cytoskeleton and inhibition of hepatocyte autophagy by okadaic acid.** *Exp. Cell. Res.*, 218 (2), 522-530.
- BLAY J., POON A.S., (1995). **Use of cultured permanent lines of intestinal epithelial cells for the assay of okadaic acid in mussels homogenates.** *Toxicol.*, 33 (6), 739-746.
- BIALOJAN C., TAKAI A., (1988). **Inhibitory effect of a marine sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics.** *J. Biochem.*, 256 (1), 283-290.
- BOEE R., GJERSTSEN B.T., VINTERMYR O.K., HOUGE G., LANOTE M., DOESKELAND S.D. (1991). **The protein phosphatase inhibitor okadaic acid induces morphological changes typical of apoptosis in mammalian cells.** *Exp. Cell. Res.*, 195 (1), 237-246.
- CARMICHAEL W.W. (1992). **Cyanobacteria secondary metabolites : the cyanotoxins.** *J. Appl. Bact.*, 72, 445-459.
- COHEN P., (1991). **Classification of protein serine/threonine phosphatases : identification and quantification in cells extracts.** *Methods in Enzymology*, 201, 389-398.
- CROCI L., DRAISCI R., LUCENTINI L., COZZI L., GIANNETTI L., TOTI L., STACCHINI A., (1995). **Influence of the extraction procedure on recovery of okadaic acid from experimentally contaminated mussels.** *Toxicol.*, 33 (11), 1511-1518.
- DIOGENE G., FESSARD V., DUBREUIL A., PUISEUX-DAO S. (1995). **Comparative studies of the action cytoskeleton response to maitotoxin and okadaic acid.** *Toxicol. In vitro.*, 9 (1), 1-10.
- DRAISCI R., CROCI L., GIANNETTE L., COZZI, L., LUCENTINI L., DE MEDICI D., STACCHINI A., (1994). **Comparaison of mouse bioassay, HPLC and enzyme**

immunoassay methods for determining diarrhoeic shellfish toxins in mussels. *Toxicon.*, 32 (11), 1379-1384.

- EAGLE H. (1955). **Propagation in fluid medium of human epidermoid carcinoma, strain KB.** *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 89, 362-364.
- FREMY J.M., PARK D. L., GLEIZES E., MOHAPATRA S.K., GOLDSMITH C.H., SIKORSKA H.M. (1994). **Application of immunochemical methods for detection of okadaic acid in mussels.** *J. Natural Toxins*, 3 (2), 95-105.
- GAVIN A.C., TSUKITANI Y., SCHORDERET D. (1991). **Induction of M-phase entry of prophase blocked mouse oocytes through microinjections of okadaic acid, a specific phosphatase inhibitor.** *Exp. Cell. Res.*, 192 (1), 75-81.
- HAYSTEAD T.A., SIMA A.T., CARLING D., HONNOR R.C., TSUKITANI Y., COHEN P., HARDIE D.G., (1989). **Effects of the tumor promoter okadaic acid on intracellular protein phosphorylation and metabolism.** *Nature*, 337 (6202), 78-81.
- HENNING K., MEYER H., KRAATZ W.G., CREMER J. (1992). **Detection of a cytotoxic substance produced by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* strain PCC 7806 : isolation and differentiation from the peptide toxin microcystin-LR by cytotoxicity assays.** *Curr. Microbiol.*, 25 (3), 129-134.
- HOLMES C.F.B., (1991). **Liquid chromatography-linked protein phosphatase bioassay; a highly sensitive marine bioscreen for okadaic acid and related diarrhetic shellfish toxins.** *Toxicon.*, 29, 469-477.
- HONKANEN R.E., ZWILLER J., MOORE R.E., DAILY S., KHATRA B.S., DUKELOW M., BOYTON A.L. (1990). **Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and 2A protein phosphatases.** *J. Biol. Chem.*, 265 (32), 19401-19404.
- HONKANEN R.E., CODISPOTI B.A., TSE K., BOYTON A.L. (1994). **Characterization of natural toxins with inhibitory activity against serine/threonine protein phosphatases.** *Toxicon.*, 32 (3), 339-350.
- ISHIDA Y., FURUKAWA Y., DECAPRIO J.A., SATTO M., GRIFFIN J.D. (1992). **Treatment of myeloid leukemic cells with the phosphatase inhibitor okadaic acid induces cell cycle arrest at either G1/s or G2/M depending on dose.** *J. Cellular Physiology*, 150, 484-492.
- KASAHARA K., KARTASOVA T., REN X.Q., IKUTA T., CHIDA K., KUROKI T. (1993). **Hyperphosphorylation of keratins by treatment with okadaic acid of BALB/MK-2 mouse keratinocytes.** *J. Biol. Chem.*, 268 (31), 23531-23537.
- KAWAKAMI H., HIGASHIHARA M., SONG X.H., KUROKAWA K., IKEBE M., HIRANO H. (1994). **Okadaic acid induces marked shape change of human platelet.** *J. Smooth Muscle Res.* 30 (2), 57-64.
- KHAN S.A., GHOSH S., WICKSTROM M., MILLER L.A., HESS R., HASCHEK W., BEASLEY V.R. (1995). **Comparative pathology of microcystin-LR in cultured hepatocytes, fibroblastes and renal hepithelial cells.** *Nat. Toxins* 3 (3), 119-128.
- KIGUSHI K., GIOMETTI C., CHUBB C.H., FUJIKI H., HUBERMAN E. (1992). **Differentiation induction in human breast tumor cells by okadaic acid and relative inhibitors of protein phosphatases.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189 (3), 1261-1267.

- LASSUS P., BARDOUIL M., TRUQUET I., TRUQUET P., MARCAILLOU-LE BAUT C., MASSELIN P. (1985). ***Dinophysis acuminata* distribution and toxicity along the south britanny coast (FRANCE) : correlation with hydrological parameters.** In : *Toxic dinoflagellates*. ANDERSON D.M., WHITE A.M., BADEN D.G. Ed. Elsevier, New York, 1985, 159-164.
- LASSUS P., BARDOUIL M., BERTHOME J.P., MAGGI P., TRUQUET P., LE DEAN L. (1988). **Seasonal occurrence of *Dinophysis* sp. along the French coast between 1983 and 1987.** *Aquat. Living Resour.*, 1, 155-164.
- LEE J.S, YANNAGI Y., KENMA R., YASUMOTO T., (1987). **Fluorometric determination of diarrhoeic shellfish toxins by high-performance liquid chromatography.** *Agric. Biol. Chem.* 51 : 877-881.
- LEVINE L., FUJIKI H., YAMADA K., OJIKI M., GJIKA H.B., VAN VUNAKIS H., (1988). **Production of antibodies and development of a radioimmunoassay for okadaic acid.** *Toxicon.*, 26, 1123-1128.
- MARCAILLOU-LE BAUT C., LUCAS D., LE DEAN L. (1985). ***Dinophysis acuminata* 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 LE BAUT 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.** *Nat. Toxins*, 2, 312-317.
- MATSUSHIMA R., YOSHIZAWA A.S., WATANABE M.F., HARADA K., FURUSAWA A.M., CARMICHAEL W.W., FUJIKI H. (1990). **In vitro and in vivo effects of protein phosphatase inhibitors, microcystins and nodularin, on mouse skin and fibroblasts.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 171 (2), 867-874.
- MATSURA S., KITA H., TAKAGAKI Y. (1994). **Specificity of mouse monoclonal anti-okadaic acid antibodies and its analogs among diarrhoeic shellfish toxins.** *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58 (8), 1471-1475.
- MOSSAN T. (1983). **Rapid colorimetric method for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxic assays.** *J. Immunol.*, 65, 5-63.
- POUCHUS Y.F., AMZIL Z., LE BAUT C., JAMES K.J., VERBIST J.F., (1996). **Specificity of the test based on the modification morphology cellular for detection proteins phosphatases inhibitors lipophile.** *Toxicon* (soumis)
- ROGERS C.G., HEROUX-METCALF C., LANGLOIS I., (1994). **Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of okadaic acid, a non-phorbol ester type tumour promoter, in V79 chinese hamster lung cells.** *Toxic. in vitro*, 8 (2), 269-276.
- SAKURADA K., ZENG B., KUO J.F. (1992). **Comparative effects of protein phosphatase inhibitors (okadaic acid and calyculin A) on human leukemia HL60, HL60/ADR and K562 cells.** *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 187 (1), 488-492.
- SCHOEMAKER R.H., ABBOTT B.J., MACDONALD M.M., MAYO J.G., VENDITT J.M., WOLPERT DE FILLIPPES M.K. (1983). **Use of the KB cell line for in vitro cytotoxicity assays.** *Cancer Treatment Reports*, 67 (1), 97.
- SHESTOWSKY W.S, QUILLIAM M., SIKORSKA H.M., (1992). **An idiotypic-anti-idiotypic copetitive immunoassay for quantitation of okadaic acid.** *Toxicon.*, 30 (11), 1441-1448.

- SIMON J.F., VERNOUX J.P., (1994). **Highly sensitive assay of okadaic acid using protein phosphatase and paranitrophenyl phosphate.** *Natural Toxins*, 2, 293-301.
- SOURNIA A., BELIN C., BERLAND B., ERARD-LE DENN E., GENTIEN P., GRZEBYK D., MARCAILLOU-LE BAUT C., LASSUS P., PARENSKY F. (1991). **Le phytoplancton nuisible des côtes de France.** Ed. IFREMER-Brest.
- STABELL O.B., HORMAZABAL V., STEFFENAK I., PEDERSON K., (1991). **Diarrhoeic shellfish toxins: improvement of sample clean-up for HPLC determination.** *Toxicon.*, 29, 21-29.
- SUGANUMA M., FUJIKI H., SUGURI H., YOSHIZWA S., HIROTA M., NAKAYASU M., OJIKI M., WAKAMATSU K., YAMADA K., SUGIMURA T. (1988). **Okadaic acid : an additional non phorbol-12-tetradecanote-13-acetate type tumor promotor.** *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 85, 1768-1771.
- SUGANUMA M., FUJIKI H., OKABE S., NISHIWAKI S., BRAUTIGAN D., INGEBRITSEN T.S. ROSNER M. (1992). **Structurally different members of the okadaic acid class selectively inhibit protein serine/threonine but not tyrosine phosphatase activity.** *Toxicon.*, 30 (8), 873-878.
- TAKAGI T., HAYASHI K., ITABASHI Y. (1984). **Toxic effet of free unsaturated fattyacids in the mousse assay of Dinophysistoxin by intraperitoneal injection.** *Bul. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 50 (8), 1413-1418.
- TAKAI A., MIESKES G., (1991). **Inhibitory effect of okadaic acid on the p-nitrophenyl phosphatase activity of protein phosphatases.** *Biochem. J.*, 275, 233-239.
- TUBARO A., SOSA S., BRUNO M., GUCCI P.M.B., VOLTERRA L., DELLA LOGGIA R., (1992). **Diarrhoeic shellfish toxins in Adriatic sea mussels evaluated by an ELISA method.** *Toxicon.*, 30, 5/6, 673-676.
- USAGAWA T., NISHIMURA M., ITHO Y., UTA T., YASUMOTO T., (1989). **Preparation of monoclonal antibodies against okadaic acid prepared from the sponge *Halichondria okadae*.** *Toxicon.*, 27, 1323-1330.
- VANDRE D.D., WILLS V.L., (1992). **Inhibition of mitosis by okadaic acid : possible involvement of a protein phosphatase 2A in the transition from metaphase to anaphase.** *J. Cell. Sci.*, 101, 79-91.
- YANAGI T., MURATA M., TORIGOE K., (1989). **Biological activities of semisynthetic analogs of dinophysistoxin-3, the major diarrhoeic shellfish toxin.** *Agri. Biol. Chem.*, 53 (2), 525-529.
- YASUMOTO T., OSHIMA Y., YAMAGUCHI M., (1978). **Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku.** *District. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 44 (11), 1249-1255.
- YASUMOTO T., OSHIMA Y., SUGAWARA W., FUKUYO Y., OGURI H., IGARASHI T., KUJITA N. (1980). **Identification of *Dinophysis fortis* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning.** *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.*, 46 (11), 1405-1411.
- ZHENG B., WOO C.F., KUO J.F. (1991). **Mitotic arrest and enhanced nuclear protein phosphorylation in human leukemia K562 by okadaic acid, a potent protein phosphatase inhibitor and tumor promotor.** *J. Biol. Chem.*, 266 (16), 10031-10034.