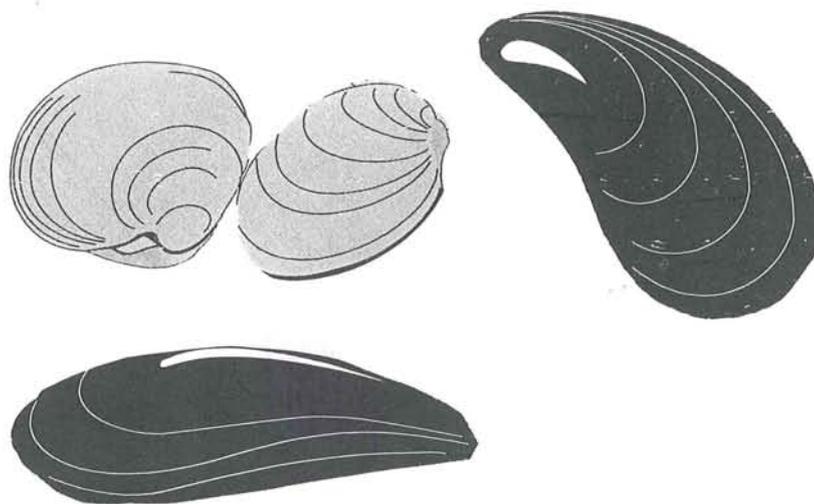


**DIRECTION DE L'ENVIRONNEMENT
ET DE L'AMENAGEMENT LITTORAL**

**Projet de recherche sur l'identification
de nouveaux composés toxiques
dans les coquillages**

par

Zouher AMZIL



FICHE DOCUMENTAIRE

Type de rapport : R S T	
Numéro d'identification du rapport : R.INT.DEL/96.07 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 35 pages bibliographie : Oui illustration(s) : 2 figures 7 tableaux langue du rapport français
Titre et sous-titre du rapport : Projet de recherche sur l'identification de nouveaux composés toxiques dans les coquillages Titre traduit : Research Project on the Identification of New Toxic Compounds in Shellfish	
Auteur(s) principal(aux) : nom, prénom <p style="text-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 :

En novembre 1992, un événement touchant à la salubrité des coquillages a été particulièrement médiatisé : une toxine indéterminée était présente dans les huîtres du bassin de Marennes-Oléron. Ce phénomène est resté jusqu'à aujourd'hui inexpliqué. Depuis, dans le cadre du réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines (REPHY), de plus en plus d'observations font état de la présence dans les coquillages d'une substance active sur souris qui n'appartient à aucune des classes de phycotoxines connues. Ces observations ont été signalées en France comme à l'étranger (Canada, Norvège, Irlande, Nouvelle Zélande...). Les souris traitées par voie intrapéritonéale selon le test de détection des toxines diarrhéiques, présentent des symptômes de type neurologique avec un mode d'action au niveau du système nerveux central précédant un décès rapide (5 à 10 minutes). Plusieurs centaines de kilogrammes de coquillages contaminés ont pu être stockés et des travaux de recherche en vue de l'identification du principe actif ont commencé dans le laboratoire Phycotoxines et Nuisances - Direction de l' Environnement et de l'Aménagement Littoral. Ainsi l'obtention de la toxine pure nous permettra d'accéder aux études de toxicologie qui nous éclaireront sur le mode d'action de cette substance et nous permettront d'évaluer son impact sanitaire. La connaissance de la nature chimique et des propriétés toxicologiques du composé incriminé permettra de développer des méthodes d'analyses physico-chimiques et/ou biologiques suivant des critères de spécificité, de rapidité et de fiabilité.

Abstract :

In November 1992, an event affecting Shellfish health received extensive media coverage: an unknown toxin had been detected in oysters from the bay of Marennes-Oleron (France). This phenomenon remains unexplained to this day. Since then, a growing number of observations obtained in the context of the REPHY phytoplankton monitoring network, have reported a mouse-active substance found in Shellfish and belonging to none of the known phycotoxin classes. These observations have been reported in France as well as abroad (Canada, Norway, Ireland, New Zealand ...). Mice treated intraperitoneally with the DSP screening test- exhibit neurological symptoms with disorders of the central nervous system leading to early death (within 5 to 10 minutes). Several hundred kilograms of contaminated Shellfish are now kept in storage and the Phycotoxins & Nuisances Laboratory at IFREMER Department of Coastal Environment has initiated a research program in an attempt to identify the active principle. After isolation of the pure toxin, we will then move on to the toxicological studies required to elucidate the mode of action of this substance and to assess its health impact. Once we have gained knowledge of the chemical nature and toxicological properties of the compound implicated, it will then become possible to develop methods of physico-chemical and/or biological analysis based on criteria of specificity, speed and reliability.

Mots-clés : toxicité atypique, test-souris, neurotoxicité, identification de principe(s) actif(s)

Keywords : atypical toxicity, mouse-test, neurotoxicity, identification of active principle(s)

Commentaire :

Sommaire

I. CONTEXTE DE L'ETUDE	5
I.1. Introduction	5
I.2. Nouvelles phycotoxines	6
I.3. Toxines atypiques	7
II. PLAN DE L'ETUDE	9
II.1. Recherche d'un test de détection biologique utilisable pour le suivi de purification	9
II.2. Etude de stabilité des toxines en fonction de différents paramètres physico-chimiques	9
II.3. Isolement de la (ou des) substance(s) toxique(s)	10
II.4. Analyse structurale et identification des substances isolées	10
II.5. Production en masse des toxines identifiées	12
II.6. Etudes toxicologiques des toxines purifiées	12
II.7. Passage au niveau surveillance	13
II.8. Durée prévue pour cette étude	13
III. RESULTATS PRELIMINAIRES	15
III.1. Toxicité atypique des moules de la baie de Lazaret ..	15
III.1.1. Matériel et méthodes	15
III.1.2. Présentation du problème sur le site	18
III.1.3. Propriétés physico-chimiques du principe actif	22
III.1.4. Propriétés toxicologiques du principe actif	23
III.2. Répartition géographique de la toxicité inexplicée des coquillages observée dans le cadre du réseau REPHY	26
IV. CONCLUSION	28
V. RECOMMANDATIONS	30
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	31

Projet de recherche sur l'identification de nouveaux composés toxiques dans les coquillages

I. CONTEXTE DE L'ETUDE

I.1. Introduction

Depuis quelques années, les phénomènes de toxicité des coquillages dus à des efflorescences d'algues phytoplanctoniques se développent en divers points du globe (France, Japon, Suède, Canada, Norvège, Pays-Bas, Espagne, Portugal, Italie, Irlande...). C'est un phénomène naturel qui se produit spontanément à la suite de conditions climatiques particulières et qui entraîne des risques pour la santé des consommateurs et des pertes économiques importantes pour les conchyliculteurs et les aquaculteurs.

Certains dinoflagellés synthétisent des toxines, mais sur 1 200 espèces de dinoflagellés connues, seule une douzaine d'entre elles sont actuellement tenues pour toxigènes. Leurs efflorescences peuvent alors être soit directement toxiques pour la faune marine, soit toxiques pour l'homme, via les coquillages, mais sans effet sur ces derniers. Dans ce dernier cas, le processus d'intoxication est toujours le même, à savoir : il y a efflorescences d'algues toxiques et celles-ci sont consommées par les poissons phytoplanctonophages ou par les coquillages filtreurs. La consommation de ces organismes contaminés provoque ainsi des intoxications alimentaires.

Les phénomènes connus de toxicité dus à des efflorescences algales ont été regroupés en cinq classes selon les signes cliniques et les toxines responsables. Pour chacune de ces classes, un nom et une abréviation française ainsi qu'une appellation anglo-saxonne internationale ont été donnés :

- les intoxications de type ciguatérique ou "Ciguateric Fish Poisoning (CFP)" sont des intoxications neurologiques et gastro-intestinales. Les toxines en cause sont la maïtotoxine et les ciguatoxines et elles sont produites par un dinoflagellé du genre *Gambierdiscus* (Bagnis *et al.*, 1980; Murata *et al.*, 1989, 1993; Le Grand *et al.*, 1991) ;
- les intoxications amnésiques par les fruits de mer (IAFM) ou "Amnesic Shellfish Poisoning (ASP)" sont provoquées par une neurotoxine, l'acide domoïque, produit par des diatomées du genre *Pseudo-nitzschia* (Bates *et al.*, 1989; Perl *et al.*, 1990; Teitlebaum *et al.*, 1990; Worms *et al.*, 1991; Smith, 1993) ;
- les intoxications neurologiques par les fruits de mer (INFM) ou "Neurologic Shellfish Poisoning (NSP)" sont provoquées par des brevetoxines produites par un dinoflagellé du genre *Ptychodiscus* (Steindinger, 1979; Baden *et al.*, 1984; Shimizu *et al.*, 1986; Gervais, 1985) ;

- les intoxications paralytiques par les fruits de mer (IPFM) ou "Paralytic Shellfish Poisoning (PSP)" sont provoquées par la saxitoxine et ses dérivés (néosaxitoxine et gonyautoxines), produites principalement par des dinoflagellés du genre *Alexandrium* (Shimizu *et al.*, 1975, 1978, 1985; Schantz *et al.*, 1975; Schantz, 1984; Shumway, 1989; Hall *et al.*, 1990; LASSUS *et al.*, 1994) ;
- les intoxications diarrhéiques par les fruits de mer (IDFM) ou "Diarrheic Shellfish Poisoning (DSP)" sont provoquées par des toxines de type acide okadaïque (AO) et ses dérivés (Dinophysistoxines, DTXs), produites principalement par des dinoflagellés des genre *Dinophysis* et *Prorocentrum* (Yasumoto *et al.*, 1978, 1980, 1989; Marcaillou-Le Baut *et al.*, 1985; Lassus *et al.*, 1985, 1988; Murata *et al.*, 1982; Murakami *et al.*, 1982; Lee *et al.*, 1989; Dickey *et al.*, 1990; Sournia *et al.*, 1991; Masselin *et al.*, 1992).

Afin de protéger les consommateurs de ces différentes intoxications, des réseaux de surveillance des eaux littorales et des zones conchylicoles ont été créés dans de nombreux pays. Ces réseaux sont chargés de détecter l'apparition d'espèces phytoplanctoniques toxigènes dans l'eau et d'effectuer des contrôles de salubrité des coquillages sur les lieux de production. Les résultats sont transmis aux autorités administratives qui peuvent prendre les mesures préventives nécessaires à la protection de la santé publique.

Cas de la France

Sur les côtes françaises métropolitaines, parmi les microalgues toxiques rencontrées, deux genres sont susceptibles de présenter un risque pour la santé publique : *Dinophysis* et *Alexandrium*. Depuis 1983, un réseau de surveillance du phytoplancton (REPHY) a été mis en place par l'IFREMER à la suite des intoxications diarrhéiques provoquées par la consommation de coquillages contaminés par des Dinophysistoxines. En cas de présence de ces algues toxiques, le REPHY procède à des tests de toxicité sur souris à partir des bivalves exposés (essentiellement des moules, mais aussi des huîtres et des tellines). Par des extractions sélectives, ces tests permettent de révéler les deux familles de toxines correspondantes : les phycotoxines diarrhéiques et les phycotoxines paralysantes. En cas de doute, et seulement dans ce cas, l'analyse physico-chimique est utilisée pour confirmation du diagnostic.

1.2. Nouvelles phycotoxines

Dans le cadre de cette surveillance, de plus en plus d'observations font état de la présence dans les coquillages de substance(s) active(s) sur souris qui n'appartient(ent) à aucune des classes de phycotoxines connues. Ces observations ont été signalées en France comme à l'étranger (Canada, Norvège, Irlande, Nouvelle Zélande...) (Marcaillou-Le Baut *et al.*, 1993; Marcaillou-Le Baut *et al.*, 1995; Amzil *et al.*, 1996 a,b; Hageltorn, 1989; Stabell *et al.*, 1991; Hungerford, 1994; Mackenzie, 1996).

Dans certains cas, il s'agirait de nouvelles phycotoxines diarrhéiques récemment identifiées appartenant à la famille de l'acide okadaïque : les Dinophysistoxines 2 et 4 (DTX2 et DTX4) et des dérivés 7-O-acyls et diol-esters de l'acide okadaïque (Hu *et al.*, 1992, 1995; Yasumoto *et al.*, 1989; Needham *et al.*, 1995; Quilliam *et al.*, 1995a; Draisci *et al.*, 1995). Le test souris de dépistage ne permet pas de mesurer la toxicité de ces produits puisqu'il fournit une évaluation globale de la toxicité des coquillages contaminés.

De plus, ces nouvelles phycotoxines ne peuvent pas être dosées par la méthode habituellement utilisée de Lee *et al.* 1987 (CLHP/dérivation à l'ADAM) car actuellement, il n'existe pas de standards purifiés disponibles pour les DTX2, DTX3 (7-o-acyl) et DTX4. Pour les diol esters, le radical COOH est occupé et ne peut pas être utilisé pour la dérivaison à l'ADAM. Leurs recherches nécessitent donc des moyens plus performants, comme la spectrométrie de masse couplée à la CLHP, à moins de les traiter chimiquement pour les convertir en O.A. ou en DTX1.

La présence de ces dérivés rend la mesure de la toxicité des coquillages encore plus difficile puisque leur devenir dans le tube digestif du mollusque ou de l'homme n'est pas encore bien établi. En effet, l'administration de cellules toxiques de *Prorocentrum lima* à des (pétoncles) *Argopecten irradians* ont permis de montrer la présence de diol-esters dans l'algue et les tissus des coquillages contaminés (viscères, manteau, gonades, branchies). La recherche de l'acide okadaïque et de ses dérivés (DTX1, DTX4 et diol-esters) a été réalisée grâce à la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide (Quilliam *et al.*, 1995b; Bauder *et al.*, 1995; Needham *et al.*, 1995), seul moyen analytique disponible actuellement. Ce qui conduit à se poser des questions sur les coquillages contaminés des côtes françaises, en particulier sur le fait de savoir si les diol-esters sont présents et s'ils sont tous convertis en A.O. ou DTX1 lors de l'analyse chimique. Sinon, la toxicité réelle des coquillages serait sous-estimée puisque jusqu'à présent on ne dose que l'AO et la DTX1 par CLHP/fluorimétrie, d'où l'intérêt d'équiper le laboratoire Phycotoxines et Nuisances de l'IFREMER d'une spectrométrie de masse couplée à la CLHP comme outil de recherche, d'expertise et de confirmation.

1.3. Toxines atypiques

Dans d'autres cas, la forte toxicité des coquillages et les symptômes des souris ont exclu l'hypothèse de dérivés de l'AO. Il est arrivé également que la présence d'AO en très faible quantité ne pouvait pas expliquer à elle seule la forte toxicité observée. Dans les deux cas, il a fallu admettre la présence d'un produit toxique inconnu.

Ainsi, en janvier 1993, les huîtres du bassin de Marennes-Oléron se sont révélées toxiques lors de tests sur souris, sans que la toxine puisse être identifiée. Ce phénomène est resté jusqu'à aujourd'hui inexpliqué. Cet événement a été particulièrement médiatisé.

Depuis, des épisodes de forte toxicité des coquillages ont été mis en évidence par le REPHY sans que l'on ait pu en expliquer la cause. En effet, aucune espèce phytoplanctonique toxigène connue n'a été observée sur les sites concernés. Ces événements ont été signalés dans des zones différentes de la côte Atlantique et de la côte Méditerranéenne (Toulon, Arcachon, Salses Leucate, La Trinité-sur-Mer, Normandie). Ils ne sont pas comparables dans leur déroulement, leur extension, leur durée, et rien ne permet de dire que l'on ait affaire au même composé toxique. En revanche, les souris traitées, par voie intrapéritonéale selon le test de détection des phycotoxines diarrhéiques, présentaient des symptômes de type neurologique avec mode d'action au niveau du système nerveux central (observation des symptômes selon des critères pharmacologiques précis) suivis d'une mort rapide (5 à 10 min).

Les analyses physico-chimiques n'ont pas révélé la présence de phycotoxines connues ou seulement des traces de phycotoxines diarrhéiques qui n'expliquaient pas des temps de survie aussi courts. De nombreux témoins négatifs (moules non toxiques) ont permis de rejeter l'hypothèse d'un artefact, et les tests-souris positifs obtenus dans les

laboratoires côtiers ont été confirmés par le laboratoire Phycotoxines et Nuisances de l'IFREMER à Nantes par la même méthode.

Pour l'étude de ces phénomènes, une procédure d'intervention d'urgence a été mise en place en 1993 (procédure ITI : Intervention Toxicité Inconnue) ayant pour objectif, de récolter de la matière première en grande quantité (bivalves toxiques, phytoplancton, particules en suspension) lorsqu'un phénomène de toxicité inexplicée survient et de débiter rapidement des études toxicologiques, puis d'isoler la substance responsable. Ainsi, une tonne de moules toxiques (en provenance de Toulon et d'Arcachon) ont pu être stockées, congelées et des travaux de recherche en vue de l'identification des principes actifs ont commencé.

L'action de ces composés toxiques sur l'homme est peu ou pas connue. Toutefois, dans le cas d'Arcachon, de nombreux témoignages (Centre Anti-Poisons, médecins, consommateurs) font état de troubles apparus dans des délais de 24 à 36 heures après ingestion de coquillages contaminés. Les manifestations le plus souvent observées étaient des nausées, des vomissements et de fortes douleurs gastriques ou abdominales, accompagnés ou non de diarrhées.

Les réponses à ce problème (origine, nature du produit toxique, action sur l'homme), indispensables pour le gérer au mieux, ne pourront être apportées à court terme car elles relèvent de la recherche. Comme la recherche de l'origine est un problème complexe, il paraissait peu réaliste d'engager des études sur plusieurs hypothèses à la fois. C'est pourquoi, nous avons privilégié l'identification de la toxine responsable. Cette identification passe par des étapes d'extraction, de concentration, de purification et d'élucidation structurale du principe actif isolé. Ceci implique de pouvoir disposer d'une grande quantité de matériel toxique et d'un test sensible pour repérer la substance active au cours des différentes étapes de la concentration/purification.

Ainsi l'obtention de la toxine pure nous permettra d'accéder aux études de toxicologie qui nous éclaireront sur le mode d'action de cette substance et nous permettront d'évaluer son impact sanitaire.

II. PLAN DE L'ETUDE

A partir des moules contaminées stockées actuellement dans le laboratoire DEL/PN, IFREMER-Nantes, nous envisageons d'isoler et d'identifier le(s) principe(s) toxique(s) en cause, puis d'étudier sa toxicité à court et à long terme pour évaluer le risque sur l'homme et de développer des techniques analytiques pour leur détection dans le cadre du réseau REPHY.

II.1. Recherche d'un test de détection biologique utilisable pour le suivi de purification

La principale difficulté de l'isolement de substances toxiques nouvelles, est de pouvoir les suivre au cours des différentes étapes de leur purification. Comme ces substances sont inconnues, il n'est pas possible d'utiliser une technique physico-chimique de détection telle que : CCM (Chromatographie sur Couche Mince), CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance), dosage chimique,... pour les repérer. Seule une méthode biologique peut permettre de suivre l'activité toxique.

Actuellement, le seul test disponible est le test de toxicité aiguë sur souris à partir des extraits de coquillages. Néanmoins, ce dernier présente un double inconvénient : il nécessite d'une part, une prise d'essai importante entraînant une perte de matière première et, d'autre part, l'usage d'animaux vivants.

C'est pourquoi, il serait indispensable de trouver une méthode alternative de détection qui soit à la fois sensible, rapide et fiable. Pour cela, nous réaliserons, dans un premier temps, une étude comparative entre l'activité de différents extraits de coquillages sur souris par rapport à d'autres tests biologiques. A partir des échantillons de moules contaminées non purifiés, il faudra mener une étude toxicologique sur différents modèles cellulaires afin de trouver un test alternatif au test souris qui nous permettrait de suivre l'activité au cours des différentes étapes de fractionnement. Ce test de cytotoxicité doit apporter si possible les mêmes informations que le test de toxicité chez la souris : quantifier un potentiel toxique et orienter vers un type donné de toxicité.

II.2. Etude de stabilité des toxines en fonction de différents paramètres physico-chimiques

La purification de principes actifs nécessite d'utiliser des techniques de fractionnement mais aussi des évaporations à chaud, des solubilisations dans différents solvants. Une étude préliminaire est donc nécessaire avant de commencer toute purification afin de connaître le comportement des substances à isoler face aux principales causes de dégradation connues, : variations de pH, élévations de température, action de la lumière, action de la congélation et contact avec les principaux solvants utilisés (hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle, méthanol, acétonitrile...).

II.3. Isolement de la (ou des) substance(s) toxique(s)

Cette phase comporte une suite de méthodes séparatives avec suivi biologique de l'activité des fractions. Elle est certainement la plus complexe et la plus longue à réaliser car, de manière générale, les toxines sont des composants minoritaires des extraits étudiés, noyés dans une infinité d'autres substances chimiques dont il faut les isoler.

Classiquement, la purification d'une substance toxique à partir d'une matière première naturelle se réalise en trois étapes : extraction, concentration des toxines et purification finale :

- l'extraction correspond au passage de la matière première à un extrait qui doit contenir l'ensemble des substances recherchées. Selon la méthode choisie, l'extrait contiendra également d'autres produits (impuretés) en quantités plus ou moins importantes ;
- la concentration correspond à un enrichissement important en substance recherchée permettant l'élimination de la majorité de ces impuretés par des méthodes de séparation ;
- enfin, la purification finale correspond à l'utilisation de techniques à hautes performances qui permettent de séparer des substances de structure chimiquement voisine.

Les méthodes de fractionnement utilisées seront : partages liquide / liquide, chromatographies liquides en colonnes ouvertes sur différentes phases stationnaires à pression atmosphérique et Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) analytique et/ou semi-préparative.

Tout au long de ces étapes, le suivi de la purification sera guidé par un test biologique choisi selon les résultats obtenus lors de l'étude préalable (cf. II.1.).

II.4. Analyse structurale et identification des substances isolées

L'élucidation de la structure des substances pures isolées se fait par l'étude de différentes données physiques :

- spectre de masse à haute résolution donnant la masse moléculaire et les principaux fragments de la molécule ;
- spectre infrarouge pour la mise en évidence de groupements chimiques importants.
- spectre RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) pour la détermination du squelette hydrocarboné et la position des principaux groupements fonctionnels.

L'identification de la (ou des) molécule(s) isolée(s) devra alors être effectuée à partir d'une quantité suffisante. Pour cela, il sera nécessaire de réaliser la purification mise au point, sur une grande quantité de coquillages toxiques.

L'élucidation structurale sera réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr. Wright dans le laboratoire de Chimie Bio-organique, Institut des Biosciences Marines, Halifax-Canada. En fait, une collaboration entre les deux laboratoires existait déjà sur les phycotoxines et elle s'est renforcée depuis l'apparition des phénomènes de toxicité inexplicables des coquillages.

En effet, des cas semblables ont été également signalés au Canada. Ils semblent se produire d'une manière régulière et périodique, laissant à penser qu'il s'agit d'un phénomène naturel peut-être lié à un cycle phytoplanctonique.

Il y a donc actuellement, en France et au Canada, une convergence de préoccupations concernant la toxicité des coquillages liées ou non aux phycotoxines. De plus, il existe une certaine complémentarité quant aux possibilités d'études à mener en collaboration. Le laboratoire de l'Institut des biosciences marines au Canada est parmi les laboratoires les plus compétents au niveau international en matière de nouvelles phycotoxines. En effet, en 1987, au cours de la recherche de l'acide domoïque (neurotoxine) dans les moules, l'équipe du Dr. Wright a montré qu'elle pouvait mobiliser des compétences et des moyens performants pour trouver l'origine et la cause d'une intoxication totalement inconnue jusqu'ici. La même équipe a réussi également à identifier une nouvelle famille de neurotoxines : les spirolides, responsable de la forte toxicité des coquillages sur souris (3 - 5 min.) observée dans l'est du Canada depuis 1991. Cette toxicité se produisait régulièrement en juin-juillet en absence d'espèces phytoplanctoniques toxiques connues.

Du côté français, la répétition des épisodes impliquant des substances toxiques inconnues a permis de récolter du matériel toxique en grande quantité et de commencer, dès 1994, l'étude chimique et toxicologique (cf. III.1. et III.2.).

Les premiers résultats obtenus sur les extraits de moules toxiques, récoltées lors d'un des épisodes (Toulon), nous ont permis d'acquérir les données suivantes : le principe actif possède une forte polarité, est thermostable, stable dans le temps et en milieu acide. L'intoxication par voie orale chez la souris a permis de constater que le produit responsable est capable de passer à travers la barrière intestinale sans être dégradé dans le tube digestif et neurotoxique au niveau du Système Nerveux Central (SNC). Le risque pour les consommateurs est donc réel. La toxicité *in vitro* a montré que les extraits de moules contaminées contiennent une neurotoxine inhibant les canaux ioniques (libération de l'acétylcholine et des ions calciques). Cette molécule agit très rapidement. Les travaux d'isolement nous ont permis d'obtenir une fraction enrichie en principe actif (Marcaillou-Le Baut et Amzil, 1995; Amzil *et al.*, 1996a,b).

Les travaux préliminaires réalisés par l'équipe du Dr. Wright à qui nous avons envoyé un échantillon en 1994, confirment nos résultats physico-chimiques et toxicologiques. Le Dr. Wright a confirmé l'absence de phycotoxines connues par spectrométrie de masse et a conclu qu'il s'agit bien d'une toxine à forte activité, inconnue à ce jour. Les chercheurs canadiens, intéressés par cette nouvelle toxine, proposent de poursuivre en commun les recherches afin d'élucider sa structure. C'est pourquoi, un stage postdoctoral de neuf mois dans leur laboratoire est prévu à partir de janvier 1997.

Objectifs du stage postdoctoral :

- Sur les phénomènes de toxicité inexplicée des coquillages :
 - Confirmer l'absence de composés toxiques connus par spectrométrie de masse dans les échantillons stockés (Toulon, Arcachon, Leucate...).
 - Mettre en commun les connaissances et les acquis pour dégager les similitudes éventuelles pouvant expliquer la cause de ces phénomènes. Il est possible que les mêmes phénomènes se soient produits dans les deux pays. Pour vérifier cette hypothèse, rechercher dans un premier temps si les mêmes toxines sont responsables de cette toxicité inexplicée en France et au Canada.
 - Déterminer la structure de la(des) substance(s) toxique(s).

- Sur les phycotoxines connues nouvellement identifiées :
 - Utiliser la spectrométrie de masse pour confirmer ou infirmer la présence de phycotoxines nouvellement identifiées (DTX2, DTX4, diol-esters...) dans des échantillons toxiques provenant des côtes Françaises (moules, huîtres, *Prorocentrum lima*).

II.5. Production en masse des toxines

Une fois le protocole de purification mis au point et les substances identifiées, une production de quantités importantes de toxines purifiées sera nécessaire pour mener à bien l'étude toxicologique.

Ce point risque de poser un problème puisque nous sommes limités par la quantité de matière première stockée. En effet, pour des raisons de plan de charge, il n'a pas été demandé aux laboratoires côtiers de l'IFREMER de poursuivre la procédure ITI qui permettait de contrôler la salubrité des coquillages en absence de phytoplancton et d'en récolter lors des phénomènes de toxicité inexplicée.

II.6. Etude toxicologique du principe actif

Les études toxicologiques du principe actif seront réalisées en deux étapes :

- d'une part, à partir des échantillons non purifiés, il faudra mener une étude toxicologique sur différents animaux de laboratoire et déterminer les points d'impact dans l'organisme (organes touchés) afin d'évaluer les risques pour les consommateurs.
- d'autre part, à partir de fractions de la toxine isolée et compte tenu des premiers résultats toxicologiques obtenus avec des extraits prépurifiés de moules contaminées de Toulon montrant une action neurotoxique et cardiotoxique (Amzil *et al.* 1996b), il serait utile de réaliser une étude 1) sur différents types cellulaires neuronaux afin d'étudier la neurotoxicité cellulaire et moléculaire pour mettre en évidence ses mécanismes d'action 2) sur différents modèles pharmacologiques pour évaluer l'activité cardiotoxique de ces toxines.

● Etude de la neurotoxicité

Les toxines purifiées feront l'objet d'études détaillées de leur neurotoxicité cellulaire : 1) sur des fibres nerveuses isolées 2) sur des lignées cellulaires neuronales en culture (neuroblastomes) 3) sur une synapse à médiation chimique modèle, la jonction neuromusculaire squelettique de vertébrés 4) sur des terminaisons nerveuses isolées (synaptosomes).

Ces études auront pour but de comprendre les éventuels effets des composés neurotoxiques purifiés au niveau des canaux ioniques membranaires. En fonction des résultats obtenus, la (ou les) cible(s) moléculaire(s) pourront être identifiées.

Cette étude sera réalisée par l'équipe du Dr. J. Molgo du laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire du CNRS à Gif/Yvette.

● Etude de la cardiotoxicité

L'étude de la cardiotoxicité portera sur l'analyse électrophysiologique de l'effet et du mode d'action du produit isolé sur le muscle cardiaque.

Les expériences seront réalisées sur l'oreillette entière isolée du coeur de la Grenouille *Rana esculenta* et sur des fibres isolées de l'oreillette. Elles porteront sur :

- 1) l'étude de l'activité électrique du muscle cardiaque : les modifications des potentiels transmembranaires de repos et d'action induits par la substance testée permettront de mettre en évidence la (ou les) conductance(s) cible(s) impliquée(s) dans la cardiotoxicité.
- 2) l'étude de la contraction des fibres cardiaques isolées du coeur de Grenouille apportera des informations sur une éventuelle modification du courant calcique impliqué dans le développement du pic de contraction et du mécanisme d'échange Na/Ca, qui régule la concentration intracellulaire durant le cycle contractile et assure la relaxation des cellules cardiaques.

Ces résultats devraient mettre en évidence la (ou les) conductance(s) cible(s) du composé et permettre de rendre compte de l'activité cardiotoxique de la substance.

Cette étude sera réalisée par l'équipe du Dr. M.P. Sauviat , Unité INSERM 451, Ecole polytechnique - ENTSA à Palaiseau.

II.7. Passage au niveau surveillance

La connaissance de la nature chimique et des propriétés toxicologiques du composé toxique permettra de développer des méthodes d'analyses physico-chimiques et/ou biologiques suivant des critères de spécificité, de rapidité, de coût.

Par ailleurs, ces méthodes de détection permettront d'étudier les processus de contamination/décontamination. Au moment où est écrit ce projet, l'origine du composé toxique étant inconnue, ces plans expérimentaux ne peuvent être envisagés que sur le terrain.

Ces derniers éléments du programme permettent d'aborder d'une manière rationnelle la stratégie de surveillance de ce phénomène.

II.8. Durée prévue pour cette étude

Le programme de recherche proposé ici, oriente les études sur la connaissance du (ou des) principe(s) toxique(s) pour les raisons explicitées au début de ce document (cf. I.3). Il est difficile de prévoir le temps nécessaire pour la purification et l'identification des substances responsables de la toxicité des coquillages. Néanmoins, en l'état actuel de nos connaissances, pour conduire à bien la totalité de ce projet, **nous envisageons une durée raisonnable de trois ans au bout de laquelle un bilan devra être établi.**

Liste des intervenants et répartition des tâches

- DEL/PN (IFREMER) :

Zouher AMZIL : purification et identification du (ou des) principe(s) actif(s)

Madeleine BOHEC : préparation des extraits à partir des coquillages, tests souris

Pierre MASSELIN : analyses CLHP

- EXTERIEURS (collaborations) :

Dr. J. MOLGO : *tests de neurotoxicité*

Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire

CNRS 91198 Gif sur Yvette CEDEX

Pr. PETIT : *toxicité in vivo*

Laboratoire de Pharmacologie

Faculté de Pharmacie, B.P. 1024 44035 Nantes CEDEX 01

Dr. Y.F. POUCHUS : *tests de cytotoxicité*

SMAB-URM11, Faculté de Pharmacie, B.P. 1024 44035 Nantes CEDEX 01

Dr. M. P. SAUVIAT : *tests de cardiotoxicité*

Ecole Polytechnique-ENSTA, Unité INSERM 451, Batterie de l'Yvette 91120 Palaiseau,

Dr J. L. C. WRIGHT : *analyse structurale des toxines purifiées*

Institut des Biosciences Marines, CNRC, 1411 Oxford Street

HALIFAX, N.S. B3H 3Z1 Canada

III. RESULTATS PRELIMINAIRES

III.1. Toxicité inexpiquée des moules de la baie de Lazaret (Toulon) entre novembre 1993 et mai 1994

L'épisode de toxicité inexpiquée des coquillages le plus important par sa durée (novembre 1993 à mai 1994) a touché la zone mytilicole dans la baie du Lazaret près de Toulon. Malgré l'absence de témoignage sérieux relatifs à des effets délétères sur l'homme, la vente a été interdite durant toute la période, ce qui mettait les consommateurs à l'abri d'un risque éventuel.

Dans un premier temps, une étude particulière du site de Toulon a donc été entreprise afin de cerner les propriétés physico-chimiques et toxicologiques du (ou des) principe(s) actif(s). Nous donnons ici les premiers résultats de cette étude.

Lors des événements du Marennes-Oléron en 1992-1993, nous avons constaté que tous les efforts entrepris pour rechercher les toxines connues avaient été mobilisés en vain. Une fois le phénomène disparu, nous avons peu ou pas de matériel toxique ni d'informations suffisantes pour prospecter dans une autre voie. L'hiver suivant, une procédure particulière ITI (Intervention Toxines Inconnues) a été mise en place pour d'une part mettre en évidence, une toxicité non imputable aux phycotoxines diarrhéiques et/ou paralysantes sans perturber profondément les techniques habituelles, et d'autre part, récolter du matériel contaminé en grande quantité si l'occasion se présente (coquillages toxiques, phytoplancton, particules en suspension).

Le phénomène le plus important par sa durée (sept mois environ) a touché les coquillages de la baie de Toulon de novembre 1993 à mai 1994. C'est pourquoi, la priorité a été donnée à l'étude des moules de Toulon.

III.1.1. Matériel et méthodes

● Matériel d'étude

Grâce à un financement exceptionnel, 500 kg de moules toxiques en provenance de Toulon ont pu être collectés en février 1994. Le décoquillage et la dissection de ces moules ont été assurés à Nantes par une dizaine de vacataires auxquels se sont joints des agents IFREMER. Les glandes digestives et la chair des moules ont été stockées séparément à -20°C en vue d'études physico-chimiques et toxicologiques du (ou des) principe(s) actif(s).

Des moules témoins non toxiques sur souris ont été également récoltées dans le golfe de Fos, à l'ouest de Marseille, en février 1994.

● Préparation des extraits de moules

Deux types d'extraits de moules ont été préparés :

- * **Extraits acétoniques** : les échantillons à tester sont préparés selon la technique habituellement utilisée par le réseau de surveillance pour la réalisation du test souris (Marcaillou-Le Baut *et al.* 1985). Trente grammes de glandes digestives sont extraits trois fois par 50 ml d'acétone, en reprenant à chaque fois le résidu après

filtration. Les phases acétoniques sont regroupées et évaporées à sec. Cette extraction, peu sélective mais simple et rapide, a été utilisée dans un premier temps pour tester les échantillons.

* **Extraits méthanoliques** : la préparation des extraits méthanoliques a été réalisée selon la technique développée par Amzil *et al.* (1992) pour le test de détection de l'acide okadaïque sur cultures cellulaires : l'extraction des glandes digestives est faite par un mélange méthanol - eau (90 : 10). Cet extrait subit ensuite un partage liquide/liquide avec de l'hexane, puis du dichlorométhane afin de séparer les solutés en fonction de leur polarité.

- **Analyses chimiques par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)**

- **Dosage des toxines diarrhéiques dans les extraits de moules**

Le dosage des phycotoxines diarrhéiques est réalisé par CLHP avec détection fluorimétrique après dérivation des toxines avec un chromophore (ADAM) selon le protocole développé par Lee *et al.* (1987).

- **Dosage des toxines paralysantes dans les extraits de moules**

Le dosage des phycotoxines paralysantes est réalisé par CLHP selon la méthode développée par Oshima (1989).

- **Test de toxicité aiguë sur souris par voie intra-péritonéale**

Le test souris consiste à évaluer la toxicité aiguë des coquillages contaminés sur des souris Swiss mâles adultes de 20 g. Ces dernières reçoivent chacune par voie intrapéritonéale l'équivalent de 5 g de glandes digestives (ou de chair) sous forme d'extrait acétonique ou méthanolique dissout dans une solution de Tween 60 à 1 %. Trois souris sont injectées par dose et l'activité, fonction inverse des temps de survie, est calculée par la formule suivante (Amzil, 1993) :

$$A = [(\sum_{i=1}^n 1/T_i) / n] \times 100$$

A : activité moyenne de l'extrait sur le test souris (moyenne de l'inverse des temps de survie)

n : nombre de souris

T_i : temps de survie pour chacune des souris en minutes

(Le facteur 100 permettant d'obtenir des valeurs plus simple à exploiter).

Cette valeur permet un classement relatif des échantillons, plus elle est élevée plus les extraits sont toxiques.

- **Test de toxicité par voie orale chez la souris**

Les souris utilisées sont de souche Swiss mâles adultes d'environ 20 g, gardées à jeun 5 heures avant le test. L'administration des extraits méthanoliques de moules se fait à l'aide d'une petite sonde. Les doses sont administrées en progression géométrique à volumes variables (volume maximal : 500 µl) et à concentration constante jusqu'à l'obtention des symptômes d'intoxication et de mortalité (Lichtfield Wilcoxon, 1949).

L'examen des souris est effectué aussitôt après l'administration des produits à tester. Il consiste essentiellement à mettre en évidence les principaux symptômes apparents

d'intoxication. Ces symptômes sont des présomptions d'atteintes de grands systèmes (système nerveux central et/ou autonome, appareil digestif, appareil respiratoire, appareil locomoteur...).

La dose létale 50 est également déterminée par la même technique.

● Test de neurotoxicité

Les techniques utilisées ont été : a) soit des techniques électrophysiologiques pour tester l'effet des extraits méthanoliques sur la conduction axonale des fibres nerveuses, la conduction musculaire, la libération d'acétylcholine (spontanée ou en réponse à la stimulation nerveuse), b) soit des techniques de chimioluminescence pour déterminer en continu le taux de libération de l'acétylcholine en réponse à la dépolarisation des synaptosomes au moyen d'une augmentation de la concentration extra cellulaire de K^+ et en réponse à un ionophore calcique (Israel et Lesbats, 1981).

Les tests ont été réalisés sur six préparations neuromusculaires isolées de vertébrés ou sur des synaptosomes cholinergiques purifiés et isolés à partir d'organe électrique de la torpille (*Torpedo marmorata*).

● Test sur le muscle cardiaque

L'activité des extraits méthanoliques sur la contraction des fibres isolées de la région sino-atriale du coeur de grenouille (*Rana esculenta*) a été recherchée aux concentrations de 100 $\mu\text{g/ml}$ et de 1 mg/ml (Sauviat *et al.*, 1993, 1994).

Une stimulation de 5 ms à la fréquence de 0,2 Hz est appliquée à la préparation par l'intermédiaire d'électrodes de platine à partir d'une unité de stimulation. La contraction enregistrée sur oscilloscope est analysée par ordinateur.

● Test de cytotoxicité sur cellules humaines KB

La lignée cellulaire KB est un carcinome du rhino-pharynx humain. Les cultures cellulaires sont maintenues dans un incubateur contenant un mélange air (95 %) - gaz carbonique (5 %), à 37 °C, dans des plaques à microtitration (96 puits) contenant le milieu de culture complet BME (milieu de base "Eagle", Eagle, 1955).

En testant plusieurs concentrations de chaque extrait acétonique ou méthanolique de moules, il est possible de déterminer la CI_{50} (Concentration Inhibant 50 % de la croissance cellulaire).

Après 72 heures d'incubation, la croissance cellulaire est évaluée par dosage colorimétrique selon le protocole développé par Mossan (1983).

● Test d'hémolyse

L'activité hémolytique des extraits méthanoliques a été testée sur des globules rouges de mouton ou de cheval (Arzul *et al.*, 1994). Après une période d'incubation de 90 min à 18 °C, la réaction est arrêtée par centrifugation (2500 tours/min pendant 10 min) et l'absorbance du surnageant est lue à 540 nm.

III.1.2. Présentation du problème sur le site

• Répartition géographique

Après avoir vérifié que la toxicité n'était pas imputable à des phycotoxines connues pour le point de prélèvement du REPHY (baie de Lazaret), il était important de connaître l'extension du phénomène. Du 17 au 22 janvier 1994, des prélèvements de moules furent effectués en différents sites de la rade de Toulon (figure 1). Ces échantillons furent traités selon la procédure habituelle de dépistage, les résultats des tests-souris sont regroupés dans le tableau 1.

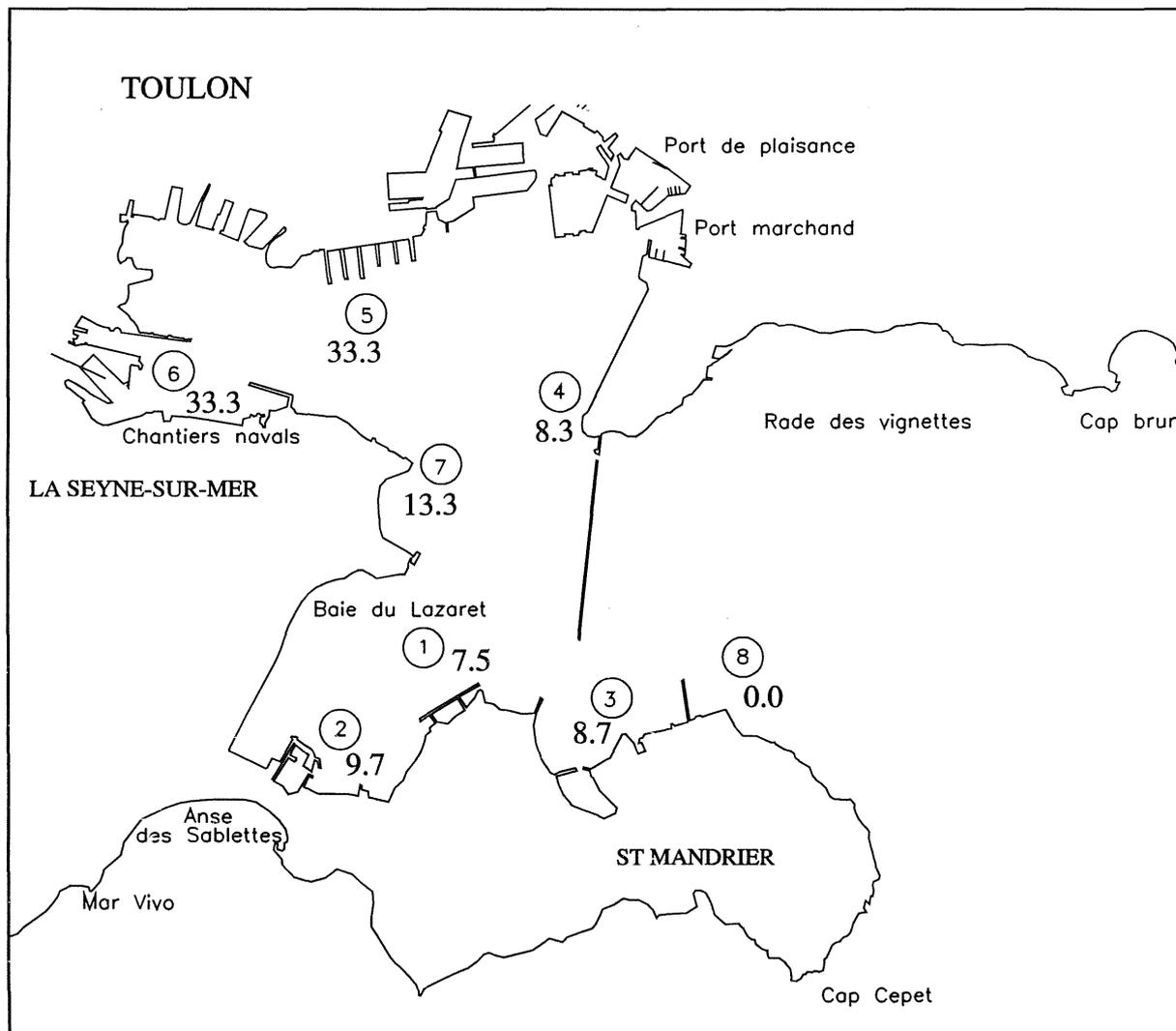


Figure 1 : Répartition géographique des niveaux de toxicité des moules (exprimés en activité) prélevées dans la semaine du 17 au 21 janvier 1994 dans la rade de Toulon.

O : numéro des stations de prélèvement

Le point 1 : point de prélèvement du REPHY.

Lieu de prélèvement	Test souris Temps de survie des souris n° 1, 2, 3 (en min)	Activité
1	14 - 14 - 12	7,5
2	6 - 8 - infini	9,7
3	12 - 13 - 10	8,7
4	8 - 8 - infini	8,3
5	3 - 3 - 3	33,3
6	3 - 3 - 3	33,3
7	5 - 5 - infini	13,3
8	non toxique	0

Tableau 1 : Résultats des tests-souris effectués sur les moules prélevées en différents sites de la rade de Toulon.

Les symptômes présentés par les souris étaient de type neurologique : sauts, paralysie des pattes arrières, tremblements, convulsions.

Un gisement de moules situé à l'extérieur de la rade (point 8) ne présentait aucune toxicité sur souris. Le phénomène semblait donc limité à la rade.

• Répartition du principe actif dans les moules

Le test souris a été réalisé sur des extraits acétoniques préparés d'une part à partir des glandes digestives et d'autre part à partir de la chair des manteaux. Les temps de survie des souris et les activités moyennes calculées à partir de ces temps sont regroupés dans le tableau 2.

	Glandes digestives	Manteaux
Temps de survie (min)	12 - 17 - 17	12 - 15 - 20
Activité (A)	6,7	6,7

Tableau 2 : Répartition de la toxicité dans les moules.

Nous remarquons que la toxicité était présente, à un niveau équivalent, dans les glandes digestives et dans la chair des manteaux.

Ceci ne s'observe pas avec les phycotoxines connues (diarrhéiques et paralysantes) qui s'accumulent essentiellement dans les hépatopancreas des coquillages filtreurs.

Par ailleurs, les analyses physico-chimiques par CLHP des extraits de moules toxiques n'ont pas mis en évidence la présence de phycotoxines diarrhéiques, en particulier l'acide okadaïque : principale toxine diarrhéique qui affecte essentiellement les moules en France. De même, la recherche par CLHP de phycotoxines paralysantes, (saxitoxine et ses dérivés) s'est révélée également négative.

L'absence de ces deux types de phycotoxines dans les moules contaminées concorde avec les observations des symptômes des souris.

● Evolution de la toxicité dans le temps

La figure 2 présente l'évolution de la toxicité des moules durant l'épisode au point REPHY de la baie du Lazaret (du 15 novembre 1993 au 6 juin 1994). Les résultats sont exprimés en activité moyenne des extraits acétoniques testés sur souris (moyenne de l'inverse des temps de survie).

L'évolution de la toxicité durant ce phénomène semble se dérouler en deux périodes, chacune correspondant à une forte toxicité des moules.

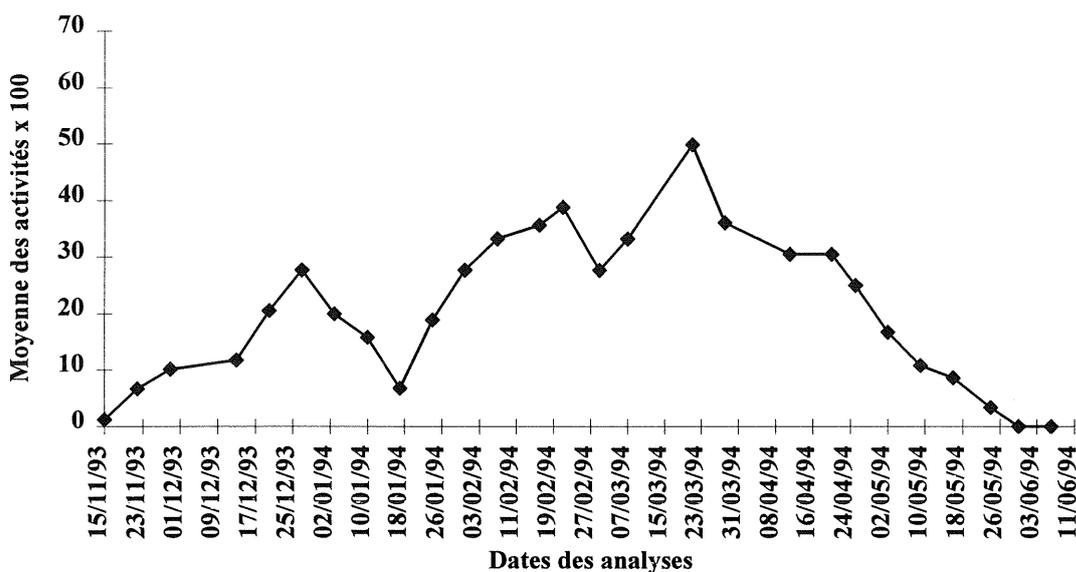


Figure 2 : Evolution de la toxicité des moules sur le point REPHY depuis l'apparition du phénomène jusqu'à sa disparition.

● Essais de contamination *in situ*

Nous avons réalisé des essais *in situ* de contamination en immergeant des moules non toxiques, provenant du golfe de Fos, dans la rade de Toulon, elles sont devenues très toxiques après cinq jours d'immersion avec une activité moyenne de 14,5.

● Elimination des causes connues

* *Particules en suspension*

Des prélèvements de particules en suspension ont été effectués dans la zone touchée et concentrés par filtration sur des tamis de différentes mailles (100 - 75 - 60 - 10 - 1 - 0,2 μm). Ces concentrats ont été testés sur souris après une extraction méthanolique. Les différents prélèvements n'étaient pas toxiques sur souris. Cependant, ce résultat peut simplement être le reflet d'une concentration insuffisante.

*** Contaminants chimiques**

La recherche de contaminants chimiques a été réalisée sur l'eau de mer et sur les moules toxiques (glandes digestives et chair) par le Laboratoire Municipal de Rouen. Elle a porté sur des métaux lourds (Zn, Pb, Cd, Hg), les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les polychlorobiphényles. Les résultats sont donnés dans les tableaux 3 et 4.

Contaminants chimiques	eau de mer incriminée (mg/l)
Plomb (Pb)	0,001
Cadmium (Cd)	< 0,0005
Mercure (Hg)	< 0,0001
Pesticides organochlorés	Non détectés

Tableau 3 : Dosage de contaminants chimiques dans l'eau de mer.

Contaminants chimiques	Hépatopancréas	Chair
Métaux (mg/kg)		
Plomb	14,6	11,8
Zinc	260	420
Cadmium	1,2	1,4
Mercure	0,92	0,64
Hydrocarbures aromatiques polycycliques (µg/kg)		
Fluoranthène	100	63
Benzo (b) fluoranthène	69	52
Benzo (k) fluoranthène	40	20
Benzo (a) pyrène	44	21
Benzo (g, h, i) pérylène	69	28
Indéno (1,2,3 cd) pyrène	32	18
Polychlorobiphényles (µg/kg)		
PCB 28	< 1	2,6
PCB 35	6	9
PCB 52	< 1	< 1
PCB 101	25	11
PCB 138	92	42
PCB 118	31	10
PCB 153	130	55
Arochlor 1242	< 10	< 10
Arochlor 1254	190	150
Arochlor 1260	470	240

Tableau 4 : Teneurs de contaminants chimiques dans les moules toxiques lyophilisées.

Les analyses montrent que les teneurs en métaux lourds, en hydrocarbures aromatiques polycycliques et en polychlorobiphényles ne peuvent expliquer dans les deux cas (eau de mer et moules) la forte toxicité des moules. Les concentrations trouvées sont très éloignées des DL50 sur souris et ne permettent pas d'incriminer ces composés. Par

exemple pour les PCB, les concentrations sont très comparables à celles mesurées dans le cadre du RNO (Réseau National d'Observation) et sont bien inférieures à celles relevées en estuaire de Seine (PCB 153 atteint 500 ng/g).

• Recherche d'une cause possible du phénomène de toxicité atypique

La présence d'une pisciculture à proximité des parcs à moules a conduit le Laboratoire côtier de Toulon à émettre l'hypothèse selon laquelle l'alimentation fournie aux poissons pourrait être un facteur de contamination bactérienne. En effet, suite à une recherche de germes pathogènes effectuée sur les moules de la baie de Lazaret, une souche bactérienne *Bacillus cereus* toxique a été observée dans les coquillages, dans les aliments utilisés en pisciculture et dans la colonne d'eau de la zone contaminée, à des concentrations étonnamment élevées. Les résultats obtenus sur les moules du Lazaret (février-mars 1994) font état de 3.10^5 CFU/ml (J. Minet, com. pers.).

Bien qu'il y ait une littérature relativement abondante sur le rôle de *B. cereus* dans les intoxications alimentaires, il n'existe aucune information sur sa présence et sa toxigenie en milieu marin.

Comme des extraits de culture de cette souche, prélevée directement sur des moules contaminées, se sont révélés toxiques sur souris, une étude comparative a été menée à la fois sur ces extraits et sur les extraits de moules toxiques. Après plusieurs étapes de séparation liquide/liquide, liquide/solide et par chromatographie sur couche mince préparative avec un suivi de la toxicité par test souris, nous avons abouti aux observations suivantes :

- l'extrait de *Bacillus cereus* présente des substances toxiques solubles dans l'eau (protéines...) qui précipitent dans le méthanol. Ceci concorde avec les données bibliographiques sur les toxines de *Bacillus cereus*. En effet, la toxine létale sur souris de cette souche est une protéine thermolabile à 50 °C et qui perd plus de 90 % de son activité dans l'éthanol par précipitation.
- le principe actif extrait des moules est, par contre, thermostable (100 °C pendant 1 h 30 min) et soluble dans le méthanol.

Nous pouvons dire que le produit toxique présent dans les moules de Toulon n'est pas lié à la présence de *Bacillus cereus*. Toutefois, la coïncidence indéniable entre la présence de ce germe et la toxicité mérite une étude plus approfondie que le Laboratoire côtier de Toulon envisage de mettre en place.

III.1.3. Propriétés physico-chimiques du principe actif

• Polarité du principe actif

Afin de cerner la polarité des substances toxiques et d'éliminer les interférences éventuelles dues en particulier aux acides gras (Takagi *et al.*, 1984), nous avons pratiqué une extraction à partir de glandes digestives (ou de chair) avec un mélange méthanol - eau suivi d'un partage liquide/liquide d'abord avec l'hexane pour entraîner les substances les moins polaires, puis avec le dichlorométhane. Les substances les plus polaires restent dans la phase méthanolique.

Les trois extraits obtenus ont été testés sur souris. Chaque souris recevant une quantité d'extrait équivalente à 5 g de matière première. Les résultats sont donnés dans le tableau 5.

	Hexane	Dichlorométhane	Méthanol - eau
Temps de survie (min)	infini - infini - infini	infini - infini - infini	4 - 3 - 4
Activité	0	0	27,8

Tableau 5 : Test souris des fractions obtenues après le partage liquide/liquide.

Seule la fraction méthanolique, obtenue après le partage liquide/liquide présente une toxicité. Le principe actif possède donc une forte polarité. De plus, l'activité de cet extrait est environ 4 fois supérieure à celle de l'extrait acétonique correspondant (A = 27,8 au lieu de 6,7).

Cette méthode permet donc de concentrer le principe actif et sera retenue pour la suite de l'étude.

• Etude de la stabilité du principe actif en fonction de différents facteurs physico-chimiques

La purification de substances actives nécessite l'utilisation des techniques de fractionnement mais également des évaporations à chaud, des lyophilisations, des solubilisations dans différents solvants, des extractions à pH variable. C'est pourquoi, dans un premier temps, avant de commencer toute purification, nous avons effectué une étude préliminaire afin de connaître le comportement de la toxine dans les coquillages face aux principales causes de dégradations connues. L'influence de ces différents facteurs est donnée dans le tableau 6.

	Non chauffé	Chauffé à 100 °C (1 h 30 min)	Lyophilisé
Temps de survie (min)	5 - 6 - 5	4 - 4 - 3	6 - 7 - 5
Activité	18,9	27,8	17,0

Tableau 6 : Etude de la stabilité du principe actif dans les extraits méthanoliques de glandes digestives de moules contaminées.

D'après les résultats obtenus, le produit toxique est thermostable puisque l'activité de l'extrait est conservée après chauffage. Il n'est pas dégradé par la lyophilisation.

De même, nous avons trouvé que le principe actif était stable dans le temps à -20 °C, stable en milieu acide (pH 2,5) et stable au contact des principaux solvants utilisés (hexane, dichlorométhane, butanol, méthanol).

III.1.4. Propriétés toxicologiques du principe actif

• Toxicité par voie orale chez la souris

L'expérimentation d'intoxication par voie orale a conclu à une dose létale 50 (DL50), déterminée selon la méthode Lichtfield-Wilcoxon (1949), de 7 g de glandes digestives de moules contaminées pour un poids moyen des souris de 22 g. Les symptômes d'intoxication indiquent une dépression centrale modérée se manifestant surtout par une réduction de l'activité motrice spontanée. Cette dépression s'aggrave rapidement avec le temps

(1 heure). Il apparaît ensuite un état de stupeur entraînant la mort au bout d'une dizaine d'heures.

Ces résultats indiquent la présence d'une substance stable et toxique pour le système nerveux central, capable de passer à travers la barrière intestinale sans être dégradée dans le tube digestif.

● Toxicité *in vitro*

* Test de neurotoxicité

Les résultats obtenus ont confirmé la neurotoxicité déjà observée *in vivo*. En effet, les études réalisées sur des préparations neuromusculaires isolées ou sur des synaptosomes cholinergiques, ont permis de dégager un certain nombre de conclusions quant à l'effet neurotoxique des extraits méthanoliques de moules contaminées par rapport à des extraits de moules témoins non toxiques. Ces observations se rapportent à des concentrations comprises entre 120 et 400 µg d'extrait par ml :

- les extraits n'affectent ni la conduction nerveuse, ni la conduction musculaire. Par conséquent, ils ne contiennent pas de toxines qui affectent le fonctionnement des canaux sodiques dépendants du potentiel (type tétrodotoxine, saxitoxine, gonyautoxines, ciguatoxines et brevétéoxines) ;
- les extraits de moules toxiques semblent avoir une action sélective sur le processus de libération de l'acétylcholine (libération spontanée et provoquée par l'influx nerveux) au niveau de la jonction musculaire.

L'extrait de moules contaminées contient donc une neurotoxine qui bloque la libération de l'acétylcholine. Ce mécanisme est original puisque encore jamais observé avec des toxines marines connues (J. Molgo, com. pers.).

* Test sur le muscle cardiaque

Les expériences montrent que l'extrait de moules toxiques testé possède deux effets distincts sur la contraction du muscle cardiaque :

- 1 - un effet inotrope positif qui se développe rapidement et durablement pour la concentration 100 µg/ml ;
- 2 - un effet inotrope négatif qui apparaît pour une concentration de 1 mg/ml et dont l'établissement dépend de la fréquence de stimulation.

Les observations conduisent aux conclusions suivantes :

- l'effet inotrope positif présente une analogie avec l'effet de l'acide okadaïque ou celui des cathécholamines sur le muscle cardiaque,
- l'effet inotrope négatif dépendant de la fréquence de stimulation suggère que l'extrait contient une molécule qui inhiberait le canal calcique. Cette molécule pourrait être de faible poids moléculaire, elle agit rapidement et semble bien se fixer dans la membrane puisque l'effet dépendant de la fréquence de stimulation persiste après lavage.

*** Test de cytotoxicité sur cellules KB**

Les différentes fractions obtenues après le partage liquide/liquide des extraits de glandes digestives de moules ont été testées sur les cellules KB afin de déterminer leurs CI_{50} . Les concentrations testées étaient 100 - 33,3 et 11,1 μg d'extrait/millilitre de milieu de culture. Le tableau 7 nous montre que seule la fraction méthanolique présente une activité cytotoxique sur la lignée KB.

Fractions testées	Hexane	Dichlorométhane	Méthanol
CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	inactif	inactif	11,5
Activité ($A = 1/CI_{50}$)	0	0	8,6

Tableau 7 : Résultat du test de cytotoxicité sur les cellules KB.

*** Test d'hémolyse**

Les mêmes fractions issues du partage liquide/liquide des glandes digestives de moules toxiques ont été testées également sur des hématies de mouton et de cheval. Les résultats obtenus ont montré qu'aucune fraction ne possédait de pouvoir hémolytique.

La toxicité *in vitro* nous montre que la fraction méthanolique présente à la fois une activité neurotoxique et une activité cytotoxique. Nous pouvons penser que le principe actif présent dans les extraits de moules possède à la fois un pouvoir neurotoxique et un pouvoir cytotoxique. Toutefois, à ce stade, rien ne nous permet de dire qu'il s'agit du même produit. C'est pourquoi, la purification du ou des principes actifs est nécessaire pour aller plus loin dans les études toxicologiques.

III.2. Répartition géographique de la toxicité inexplicée des coquillages observée dans le cadre de REPHY

Tous les épisodes de toxicité inexplicée des coquillages sont récapitulés dans le tableau 8. Pour chacun, nous avons retenu les échantillons sur lesquels nous avons réuni les informations les plus édifiantes quant au problème soulevé. La forte toxicité des coquillages a été observée pour la première fois le 13 novembre 1992 et le 26 janvier 1993 dans le Pertuis breton. L'injection intrapéritonéale des extraits de coquillages à des souris provoquait leur mort au bout de 3 minutes. Durant cette période, aucune espèce phytoplanctonique toxique connue n'a été détectée dans les eaux contaminées. Quarante huit heures plus tard, le test souris, avec les mêmes extraits de coquillages, a donné des résultats négatifs traduisant ainsi l'instabilité de la toxine inconnue, ce qui montre qu'il ne s'agissait pas de toxines paralysantes connues qui, elles, sont stables. De plus, l'analyse CLHP a confirmé l'absence de phycotoxines paralysantes (Marcaillou-Le Baut et Belin, 1993).

Depuis, des toxicités inexplicées ont été mises en évidence, en différents points des côtes françaises (Toulon, Arcachon, Salses-Leucate, Normandie, Auray), lorsque des tests souris liés à la présence inhabituelle de *Dinophysis spp* en faible quantité dans l'eau, se sont révélés très positifs. Le cas de l'étang de Salses-Leucate est très intéressant puisque le phénomène s'est répété trois années consécutives à la même période (mai-juin). Est-ce un phénomène naturel reproductible ?

Les temps de survie étaient très courts (5 - 10 min) et les symptômes présentés par les souris étaient de type neurologique (convulsions, sauts, tremblements). L'analyse physico-chimique a révélée soit une absence de phycotoxines connues soit des traces de phycotoxines diarrhéiques ne suffisant pas à expliquer cette forte toxicité. C'est pourquoi, dans un premier temps et quand la quantité de coquillages contaminés le permettait, nous avons cherché à cerner les propriétés physico-chimiques du principe actif (polarité, stabilité à la chaleur, stabilité au contact de différents solvants).

En Irlande, un cas similaire de toxicité inexplicée des coquillages a été signalé en 1995. En effet, ce sont des intoxications de consommateurs néerlandais qui ont soulevé le problème. Ces moules, en provenance de la côte ouest d'Irlande, avaient donné des résultats négatifs sur test rat le 31 octobre 1995 [test de référence pour les phycotoxines diarrhéiques pratiqué en Irlande (Kat, 1983)]. Plus tard (10 novembre), des moules de la même zone, commercialisées en Hollande, se sont révélées toxiques, avec ce même test. D'autres prélèvements dans cette zone ont confirmé d'une part la toxicité sur rat et sur souris, et d'autre part l'absence de phycotoxines connues. Depuis la mi-septembre, aucune espèce phytoplanctonique toxique n'avait été observée dans l'eau. En février, la zone était toujours fermée pour les mêmes raisons.

Nous avons donc traité également un échantillon de moules irlandaises afin de dégager des similitudes éventuelles avec les échantillons français.

L'analyse de l'ensemble de ces événements a permis des observations convergentes, d'une part, entre le cas de Toulon, Arcachon, Salses-Leucate et Auray et, d'autre part, entre les phénomènes survenus en Normandie et en Irlande. Ceci ne signifie pas qu'il s'agisse du(des) même(s) principe(s) actif(s).

Dans le premier cas, seuls les extraits méthanoliques, obtenus après le partage liquide/liquide, se sont révélés toxiques, ce qui montre que le principe actif est de forte

polarité. Les symptômes présentés par les souris étaient de type neurologique : grande agitation, sauts dans la cage, difficulté respiratoire, mort par paralysie en moins de 10 min.

Dans le deuxième cas, la toxicité s'est manifestée dans les deux fractions méthanolique et chlorométhylénique mais avec des symptômes différents. En effet, les extraits méthanoliques ont provoqué la mort des souris sans symptômes nerveux (immobilité, pas de réaction aux stimuli) tandis que les extraits chlorométhyléniques présentaient une forte toxicité avec un effet neurotoxique. Par ailleurs, l'analyse physico-chimique (CLHP) de ces derniers a révélé la présence d'une faible quantité d'acide okadaïque (Normandie) ou acide okadaïque/DTX2 (Irlande). D'après les symptômes observés. Il s'agit probablement d'une substance de polarité moyenne, différente des toxines diarrhéiques.

Dans tous les cas, les phases hexane ont été sans effet. Ceci permet d'écartier l'interférence avec les acides gras (toxiques pour souris par voie *i.p.* et extractibles par l'hexane) souvent évoquée lorsqu'on utilise une extraction acétonique (Takagi, 1984).

De plus, d'autres études préliminaires nous ont permis d'acquérir les données suivantes :

- 1) Pour quatre épisodes où cela a été vérifié (Auray, Arcachon, Toulon, Irlande), le principe actif est thermostable puisque l'activité persiste après cuisson des échantillons pendant 1 heure 30 min à 100 °C.
- 2) La chair des moules d'Antifer (Normandie) et de la baie du Lazaret (Toulon) qui a été traitée comme les glandes digestives, s'est révélée également toxique mais à un moindre degré .

Aucune enquête épidémiologique n'ait été entreprise suite à ces événements, cependant des témoignages de consommateurs ont été enregistrés au cours des épisodes d'Arcachon et d'Irlande. Les symptômes décrits n'étaient pas spécifiques d'un type d'intoxication : diarrhée, vomissement, douleur abdominale. Le délai d'apparition après l'ingestion, quand il est mentionné, se situe au delà de 12 heures. Toutefois, dès que la toxicité a été décelée par le réseau de surveillance, la décision d'interdire la vente des coquillages contaminés du secteur concerné a été prise.

IV. CONCLUSION

Les études préliminaires réalisées sur les glandes digestives de moules toxiques, récoltées lors d'un des épisodes à toxine atypique (rade de Toulon), nous ont permis d'acquérir les données suivantes : le principe actif possède une forte polarité, il est thermostable, et il est stable dans le temps à -20 °C et en milieu acide. L'intoxication par voie orale chez la souris a permis de constater que le produit actif est neurotoxique au niveau du système nerveux central et capable de passer à travers la barrière intestinale chez la souris. Le risque pour les consommateurs semble donc réel bien qu'aucune pathogénicité chez l'homme n'ait pu être confirmée. La toxicité *in vitro* a montré que les extraits de moules contaminées contiennent une neurotoxine à action rapide inhibant les canaux ioniques (libération de l'acétylcholine et des ions calciques). Le processus de contamination est rapide puisque des moules saines deviennent toxiques en cinq jours.

Après avoir mis au point les premières étapes de séparation sur un échantillon de moules toxiques (recherche des solvants les plus performants), une prépurification du(des) principe(s) actif(s) a été effectuée sur une grande quantité de glandes digestives de moules en utilisant des techniques de fractionnement liquide/liquide, liquide/solide et chromatographiques sur phase stationnaire inverse. Nous disposons actuellement d'une fraction riche en principe actif pour continuer la purification et identifier la substance toxique.

L'obtention du principe actif pur nous permettra de mener des études de toxicologie afin de caractériser son mode d'action et d'évaluer le risque sanitaire. Enfin, la connaissance de la nature chimique et des propriétés toxicologiques de la substance permettra de développer des méthodes d'analyses physico-chimiques et/ou biologiques suivant des critères de spécificité, de rapidité et de fiabilité. La maîtrise des techniques de détection semble actuellement une des meilleures voies de recherche sur l'origine de cette substance.

De la même façon, nous avons débuté l'étude des moules toxiques d'Arcachon et de Salses-Leucate récoltées lors de phénomènes de toxicité inexpliquée. Dans les deux cas, le principe actif a le même effet neurotoxique sur souris, il possède une forte polarité et il est thermostable. Toutefois, à ce stade, rien ne nous permet de dire s'il s'agit du même produit. C'est pourquoi, la purification du(des) principe(s) actif(s) est nécessaire.

Le cas de Salses-Leucate est très intéressant car la toxicité a été observée trois années de suite en mai/juin 1993, 1994 et 1995. S'agit-il du même produit? Ce phénomène de toxicité est-il reproductible? Est-ce un phénomène naturel? La reproductibilité et la nature du produit toxique ne sont pas élucidées à ce jour.

Contrairement aux cas de Toulon et de Salses-Leucate, la chair des manteaux de moules d'Arcachon n'est pas toxique. De plus, dans ce dernier cas, de nombreux témoignages (centre anti-poisons, médecins, consommateurs) ont fait état de troubles gastriques de 24 à 36 heures après ingestion de coquillages contaminés.

Concernant le cas de la Normandie, faute de matière première en grande quantité, nous pouvons seulement dire que les faibles teneurs en acide okadaïque trouvées dans les fractions chlorométhyléniques n'expliquaient pas à elles seules la forte toxicité observée sur souris. Ceci est probablement dû à la présence d'une autre substance neurotoxique indéterminée de polarité moyenne et qui agit en synergie avec l'acide okadaïque. Nous avons abouti à la même conclusion avec des moules contaminées d'Irlande.

L'ensemble des travaux réalisés sur la toxicité inexplicée des coquillages en France a fait l'objet :

- d'une communication dans *Toxicon* en 1995.
- d'une communication par affiche (poster) présentée à la 7ème Conférence Internationale sur les Toxines Marines à Sendaï - Japon en juillet 1995,
- d'un article dans "*Harmful and Toxic Algal Blooms* - IOC-UNESCO", 1996,
- d'une communication orale et d'un article dans la 9ème Conférence Internationale sur les Mycotoxines et les Phycotoxines "IUPAC", 27-31 mai, Rome - Italie.

Il est difficile de conclure sur les phycotoxines car c'est un domaine en pleine évolution. On découvre de nouvelles espèces phytoplanctoniques toxigènes, de nouvelles toxines, les réseaux de surveillance mettent en évidence de nouvelles zones contaminées.

L'ensemble de ces observations inhabituelles génère une réflexion sur l'impact sanitaire englobant les objectifs du réseau de surveillance et les méthodes de contrôle utilisées. En effet, les préoccupations actuelles de la santé publique évoluent de plus en plus vers la prise en compte simultanée des risques à court terme (gastro-entérites...) et à long terme (cancérogène...).

Lors des événements à toxines atypiques, deux éléments laissaient penser qu'il existait un risque réel pour la santé humaine : les témoignages des consommateurs et la toxicité par voie orale chez la souris des extraits des moules de Toulon. Afin de garantir la protection des consommateurs, il est donc urgent de remettre en place la procédure d'Intervention Toxines Inconnues (ITI) qui permet de stocker de grande quantité de matériel toxique en cas de toxicité inexplicée des coquillages. Elle permettra d'identifier les agents en cause, d'étudier les propriétés toxicologiques qui peuvent poser des problèmes sanitaires, développer et valider les méthodes de détection et de contrôle appropriées.

V. RECOMMANDATIONS

Il faudrait mettre en place des procédures standardisées d'analyses des phycotoxines afin que le laboratoire Phycotoxines et Nuisances devienne un laboratoire de référence. Ceci dans le but de le positionner au niveau international et en particulier au niveau européen. Cela permettrait, en plus de sa mission d'expertise, d'apporter des contrats de recherche, de participer et de contribuer aux opérations organisées au niveau européen et international. Afin d'atteindre ces objectifs, nous commencerons par **optimiser et unifier les méthodes d'analyses chimiques existantes au sein du laboratoire pour le dosage de l'acide okadaïque et de la DTX1.**

Actuellement, le laboratoire Phycotoxines et Nuisances est en mesure de doser seulement l'AO, la DTX1 et les phycotoxines paralysantes (saxitoxines et ses dérivés) mais pas d'autres phycotoxines telles que les dérivés de l'AO (DTX2, DTX3, DTX4 et les diol-esters), l'acide domoïque (AD), les Pectenotoxines (PTXs), les Yessotoxines (YTXs), les Brévétotoxines (BTXs) et les Ciguatoxines (CTXs).

✓ **Il serait donc nécessaire de développer des méthodes d'analyses de toutes les phycotoxines diarrhéiques nouvellement identifiées.** En fait, malgré le caractère non toxique des diols-esters, ces composés sont transformés en AO par hydrolyse enzymatique. Par conséquent, il faudrait vérifier si les coquillages contaminés par les Dinophysistoxines des côtes françaises contiennent des diols-esters et les DTX2-4.

C'est pourquoi, devant le nombre croissant de rapports signalant la présence de ces phycotoxines et du fait du risque qu'ils représentent, le laboratoire communautaire de référence recommande de les rechercher systématiquement. Pour cela, **il est urgent de s'équiper d'une spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide** qui permettra de détecter tous les composants de la famille de l'acide okadaïque contenus dans les coquillages et dans les espèces phytoplanctoniques impliquées. De plus, un tel système analytique est nécessaire à la détection des autres phycotoxines connues (saxitoxines, acide domoïque, brevetoxines, yessotoxines, maïtotoxine, ciguatoxine) et de leurs dérivés, ainsi qu'à l'identification de nouvelles toxines issus du phytoplancton. L'acquisition de ce type d'équipement par l'équipe de notre laboratoire comme outil de recherche, d'expertise et de confirmation contribuera à constituer **un pôle de compétence en Europe avec les autres pays** qui sont déjà équipés d'un tel système analytique (Canada, Irlande, Italie, Suède).

✓ Concernant les autres phycotoxines connues (l'AD, les PTXs, les BTXs, les YTXs et les CTXs) qui existent dans les zones côtières des pays voisins de la France, il serait utile de **développer et de mettre en place des méthodes de détection chimique et/ou biologique de ces phycotoxines.**

Pour accélérer ce processus méthodologique, il serait souhaitable de **renforcer les échanges et les coopérations entre notre laboratoire et les laboratoires extérieurs.**

✓ Enfin, il faudrait **développer des méthodes alternatives ou nouvelles fiables de détection chimique ou biologique des phycotoxines connues.** Ceci avec un souci d'optimisation des moyens matériels et une optimisation du temps de travail du personnel.

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.** *Toxicon.*, 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.*
- AMZIL Z., MARCAILLOU-LE BAUT C., BOHEC M. (1996a). **Unexplained toxicity in molluscs gathered during phytoplankton monitoring.** *Toxic Marine Phytoplankton* (sous presse).
- AMZIL Z., MARCAILLOU-LE BAUT C., BOHEC M. (1996b). **Toxicité inexplicquée des moules de la baie de Lazaret (Toulon) entre novembre 1993 et mai 1994.** Etat d'avancement des travaux. *Rapport interne DEL/ 96.02/Nantes.*
- ARZUL G., GENTIEN P., CRASSOUS M.P. (1994). **A haemolytic test to assay toxins excreted by the marine dinoflagellate *Gyrodinium cf. aureolum*.** *Wat. Res.*, 28 (4), 961-965.
- BADEN D.G., MENDE T.J., POLI M.A., BLOCK R.E. (1984). **Toxins from Florida's red tide dinoflagellate *Ptychodiscus brevis*.** In *Seafood Toxins*, ACS Series 262, Washington, 359-367.
- BAGNIS R., CHANTREAU S., CHUNGUE E., YASUMOTO T., (1980). **Origins of ciguatera fish poisoning : a new dinoflagellate, *Gambierdiscus toxicus* definitively involved as a causal agent.** *Toxicon.*, 18, 199-208.
- BATES S.S. (1989). **Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from eastern Prince Edward Island, Canada.** *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46 : 1203-1215.
- BAUDER A., CEMBELLA A.D., QUILLIAM A., (1995). **Dynamics of diarrhetic shellfish toxins from the dinoflagellate *Prorocentrum lima* in the bay scallop, *Argopecten irradians*.** In 7th Int. Symp. on Toxic Marine Phytoplankton, July 1995, Sendai, Japon.
- DICKEY R.W., BOBZIN S.C., FAULKNER D.J., BENCSATH F.A., ANDRZEJEWSKI D., (1990). **Identification of okadaic acid from a Caribbean dinoflagellate, *Prorocentrum concavum*.** *Toxicon.*, 28 (4), 371-377.
- DRAISCI R., LUCENTINI L., GIANNETTE L., BORIA P., STACCHINI A., (1995). **Detection of diarrhoeic shellfish toxins in mussels from Italy by ionspray liquid chromatography-mass spectrometry.** *Toxicon.*, 33 (12), 1591-1603.
- EAGLE H. (1955). **Propagation in fluid medium of human epidermoid carcinoma, strain KB.** *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 89, 362-364.
- GERVAIS A.J., MAC LEAN J.L., (1985). **Management of fisheries and public health problems associated with toxic dinoflagellates.** In *Toxic Dinoflagellates*. White, Anderson et Baden Eds. Elsevier, Amsterdam. 530-533.

- HAGELTORN M. (1989). **Algal toxins contaminating shellfish and shellfish monitoring in Sweden.** In 7th International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Tokyo, Japan, 16-19 August 1988. S. NATORI, K. HASHIMOTO and Y. UENO (Eds). *Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.*
- HALL S., STRICHARTZ G., MOCZYDLOWSKI E., RAVINDRAN A., REICHARDT P.B., (1990). **The saxitoxins : Sources, Chemistry, and Pharmacology.** In **Marine Toxins : origin, structure, and molecular pharmacology.** *American Chemical Society*, 29-65.
- HU T., MARR Y., (1992). **New diol esters isolated from cultures of the dinoflagellates *Prorocentrum lima* and *Prorocentrum concavum*.** *J. Natural Products*, 55 (11) : 1631-1637.
- HU T., CURTIS J.M., WALTER J.A., WRITH J.L.C., (1995). **Identification of DTX4, a new water-soluble phosphatase inhibitor from the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima*.** *J. Chem. Sci. Chem. Commun.* : 597-599.
- HUNGERFORD J.M. (1994). **Seafood toxins.** *Journal of AOAC International*, 77 (1), 145-150.
- KAT M., (1983). **Diarrhoeic mussel poisoning in the Netherlands related to the occurrence to dinoflagellate *Dinophysis acuminata*.** *Antonie Van Leeuwenhoek*, 49, 417-427.
- LASSUS P., LE DOUX M., BARDOUIL M., BOHEC M., ERARD-LE DENN E., (1994). **Kinetics of *Alexandrium minimum* Halim toxin accumulation in mussels and clams.** *Natural toxins*, 2, 329-333.
- LASSUS P., BARDOUIL M., TRUQUET I., TRUQUER 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, 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 Ressour.*, 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.
- LEE J.S., IGARASHI T. FRAGA S, DAHL E., HOVGAARD P., YASUMOTO T., (1989). **Determination of diarrhoeic shellfish toxins in various dinoflagellate species.** *Journal of Applied Phycology*, 1, 147-152.
- LE GRAND A.M., (1991). **Les toxines de la ciguatéra.** In : *proceeding of symposium on marine biotoxins*, 30-31 janvier 1991. Fremy J.M. Ed. CNEVA, Paris, 53-59.
- LICHTFIELD - WILCOXON F.A. (1949). **Simplified method of evaluation dose-effect experiment.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 95, 99-113.

- ISRAEL M , LESBATS B. (1981). **Chemiluminescent determination of acetylcholine, and continuous detection of its release from torpedo electric organ synapses and synaptosomes.** *Neurochemistry International.*, 3 (1), 81-90.
- MACKENZIE L., HAYWOOD A., ADAMSON J., TRUMAN P., TILL D., SATAKE M., YASUMOTO T. (1995). **Gymnodimine contamination of shellfish in New Zealand.** 7th International Symposium on Toxic Marine Phytoplankton, Seandai, Japan, Juillet 1995.
- 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. and BELIN C., (1993). **Unknown poison found in French Atlantic shellfish.** In: *Harmful Algae news* N°5.
- MARCAILLOU-LE BAUT C. and AMZIL Z. (1995). **Unexplained toxicity in molluscs found in the course of phytoplankton monitoring.** *Toxicon.*, 33 (9), 1127.
- MASSELIN P., LASSUS P., BARDOUIL M., (1992). **High performance liquid chromatography analysis of diarrhoeic toxins in *Dinophysis* spp. from the French coast.** *Journal of Applied Phycol.* 4 : 385-389.
- MOSSAN T. (1983). **Rapid colorimetric method for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxic assays.** *J. Immunol.*, 65, 5-63.
- MURAKAMI Y., OSHIMA Y., YASUMOTO T., (1982). **Identification of okadaic acid as a toxic component of a marine dinoflagellate *Protocentrum lima*.** *Bull. Jap. Soc. Fish.*, 48 (1), 69-72.
- MURATA M., SHIMATANI M., SUGITANI H., OSHIMA Y., YASUMOTO T., (1982). **Isolation and structural elucidation of the causative toxin of diarrhoeic shellfish poisoning.** *Bull. Jap. Soc., Fish.*, 48 (4), 549-552.
- MURATA M., LE GRAND A.M., ISHASBASHI Y., YASUMOTO T., (1989). **Structure of ciguatoxin and its congener.** *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 8929-8931.
- MURATA M. NAOKI H., IWASHITA T., MATSUNAGA S., SASAKI M., YOKOYAMA A., YASUMOTO T., (1993). **Structure of Maitotoxin.** *J. American Chemical Society*, 115, 2060-2062.
- NEEDHAM J., HU T., MCLACHLAN J.L., WALTER J.A., WRIGHT J.L., (1995). **Biosynthetic studies of the DSP toxin DTX-4 and an okadaic acid diol ester.** *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1623-1624.
- OSHIMA Y. (1989). **Latest advances in HPLC analysis of paralytic shellfish toxins.** In *7th Int. IUPAC Symp. on Phycotoxins* (Tokyo), editeurs Elsevier, Amsterdam, 319-326.
- PERL T.M., BEDARD L., KOSATSKY T., HOCHIN J.C., TODE E., REMIS R.S., (1990). **An outbreak of toxic encephalopathy caused by eating mussels contaminated with domoic acid.** *New England J. Med.*, 322, 1775-1780.

- QUILLIAM M.A., (1995a). **Analysis of diarrhoeic shellfish poisoning toxins in shellfish tissue by liquid chromatography with fluorometric and mass spectrometric detection.** *Journal of AOAC International*, 78 (2), 555-570.
- QUILLIAM M.A., HARDSTEFF W.R., ISHIDA N., MCLACHLAN J.L., REEVES A.R., ROSS N.W., WINDUST A.J., (1995b). **Production of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins by *Prorocentrum lima* in culture and development of analytical methods.** In 7th Int. Symp. on Toxic Marine Phytoplankton, July 1995, Sendai, Japon.
- SAUVIAT M.P., CHESNAIS J.M., CHOUCKRI N., DIACONO J., BIARD J.F. and VERBIST J.F. (1993). **The polyether bistramide A affects the calcium sentivity of the contractile proteins in frog atrial heart muscle.** *Cell. Calcium*, 14, 301-309.
- SAUVIAT, M-P., MORE, M-T. and VERBIST, J-F. (1994). ***Pachymatisma johnstonii* extract opens ATP-sensitive potassium cannels in cardiac myocytes of the frog heart.** *Molecular and Cellular Neurosciences.*, 5, 499-504.
- SCHANTZ E.J., GHAZAROSSIAN V.E., SCHNOES H.K., STRONG F.M., SPRINGER J.P., PEZZANITE J.O., CLARDY J. (1975). **The structure of saxitoxin.** *J. Am. Chem. Soc.*, 97, 1238-1239.
- SCHANTZ E.J. (1984). **Historical perspective of paralytic shellfish poison.** In *Seafood Toxins*, ACS, series 262, Washington, 99-111.
- SHIMIZU Y., ALAM M., OSHIMA Y., FALLON W.E. (1975). **Presence of four toxins in red tide infested clams and cultured *Gonyaulax tamarensis* cells.** *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 66, 731-737.
- SHIMIZU Y., HSU C.P., FALLON W.E., OSHIMA Y., MIURA I., NAKANISHI K. (1978). **Structure of neosaxitoxin.** *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 6791-6793.
- SHIMIZU Y., GUPTA S., NORTE M., HORI A., GENENAH A., KOBAYASHI M. (1985). **Biosynthesis of paralytic shellfish toxins.** In *Toxic Dinoflagellates*, Elsevier, Amsterdam, 271-274.
- SHIMIZU Y., CHOU H., BANDON H. (1986). **Structure of brevetoxin A (GB-1 toxin), the most potent toxin in the Florida red tide organism *Gymnodinium breve* (*Ptychodiscus brevis*).** *J. Am. Chem. Soc.*, 108, 514-515.
- SHUMWAY S.E., (1989). **Toxic algae : a serious threat to shellfish aquaculture.** *World aquaculture* 20 (4), 65-74.
- SMITH J.C., (1993). **Toxicity and *Pseudonitzschia pungens* in Prince Edward Island, 1987-1992.** *Harmful Algae News*, n°6, 1-8.
- 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 Fance.** Ed. IFREMER, Brest 1991.
- STEINDINGER K., (1979). **Collection, enumeration and identification of free-living dinoflagellates.** In *Toxic dinoflagellate blooms*. Taylor, Seliger, Ed. Elsevier, North Holland, New York, 435-442.

- STABELL O.B., YNDESTAD M., HEIDENREICH (1991). **Paralytic shellfish toxins seem absent in extracts of diarrhoeic shellfish toxins.** *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10, 331-334.
- TAKAGI T., HAYASHI K., ITABASHI Y. (1984). **Toxic effect of free unsaturated fatty acids in the mouse assay of Dinophysistoxin by intraperitoneal injection.** *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 50 (8), 1413-1418.
- TEITELBAUM J.S., ZATORRE R.J., CARPENTER S., GENDRON D., EVANS A.C., GJEDDE A., CASHMAN N.R., (1990). **Neurologic sequelae of domoic acid intoxication due to the injection of contaminated mussels.** *New Engl. J. Med.*, 322, 1781-1787.
- WORMS J., BATES S., SMITH J.C., CORMIER P., LEGER C., PAULEY K., (1991). **Domoic acid, a neurotoxin produced by the Pennate diatom *Nitzschia pungens forma multiseriis* : An overview of some recent ecological and physiological observation.** In Proceeding of Symposium on marine biotoxins. Freyre J.M. Ed. CNEVA, Paris, 35-42.
- 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., FUJITA N. (1980). **Identification of *Dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhoeic shellfish poisoning.** *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 46, 1405-1411.
- YASUMOTO T., MURATA M., LEE J.S., TORIGOE K., (1989). **Polyether toxins produced by dinoflagellates.** In : Mycotoxins and Phycotoxins 88. Natori S., Hashimoto K. and Veno T. Eds., Elsevier, Amsterdam : 375-382.