

UNIVERSITE DE NANTES

Institut Universitaire Professionnalis  de Chimie-biologie

**DOSAGE BIOCHIMIQUE DE L'ACIDE OKADAIQUE
PAR INHIBITION DES PROTEINES PHOSPHATASES**

Laboratoire Phycotoxines et Nuisances IFREMER - Nantes

présenté et soutenu
le 16 septembre 1996

par

Eric LE PLOMB

Maîtrise de génie chimique

option "Biologie appliquée à l'agro-alimentaire"

Mon choix d'effectuer mon stage au sein du Laboratoire Phycotoxines et Nuisances de l'IFREMER-Nantes a été guidé par mon intérêt et ma passion pour le milieu marin. Le sujet de recherche sur la détection de l'acide okadaïque était très intéressant, il m'a permis d'utiliser au mieux les connaissances acquises à l'IUP de Chimie-biologie.

Que ceux qui ont participé à la réalisation de ce stage, trouvent ici mes plus sincères remerciements.

Monsieur Patrick LASSUS,

Directeur du Laboratoire Phycotoxines et Nuisances(DEL/PN) de L'IFREMER-Nantes
Pour votre accueil et votre soutien au sein du laboratoire.

Madame Claire MARCAILLOU-LE BAUT

Maître de stage - Responsable scientifique
Vous m'avez permis de réaliser ce travail dans de très bonnes conditions.

Monsieur Zouher AMZIL

Vous m'avez conseillé et soutenu tout au long de ce travail.

Madame Florence MONDEGUER

Pour votre travail en CLHP et votre disponibilité.

Monsieur Pierre MASSELIN, Monsieur Phillippe TRUQUET, Madame Véronique SECHET, Madame BOHEC et Mademoiselle Michelle BARDOUIL

Pour vos compétences et votre gentillesse.

Monsieur Jean-Paul VERNOUX et Monsieur Michel MARQUAIS

Directeur de l'Unité toxicologique du Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Moléculaire de l'Université de Caen

Pour votre accueil et votre aide au sein de votre laboratoire.

Monsieur Yvon CADIOU

Pour votre aide en informatique.

Monsieur Patrick GENTIEN

Pour m'avoir accueilli au sein de la campagne Dinoseine.

Sommaire

Présentation de l'IFREMER	5
INTRODUCTION	7
I. Les phénomènes d'efflorescence algales	8
II. Intoxications Diarrhéiques par les Fruits de Mer (I.D.F.M.)	9
II.1. Les algues	9
II.2. Les symptômes	9
II.3. Les toxines	10
II.4. Les méthodes de détection des toxines diarrhéiques	11
II.4.1. Les méthodes biologiques	11
II.4.2. Les méthodes physico-chimiques	12
III. Les phosphatases	12
METHODOLOGIE	13
I. Obtention des extraits de moules	14
I.1. Origine	14
I.2. Principe d'extraction de l'acide okadaïque	14
II. Obtention de la protéine phosphatase	16
II.1. Protéine phosphatase de lapin	16
II.1.1. Extraction de la protéine phosphatase 2A (PP2A)	16
II.1.2. Activité de l'extrait enzymatique	16
II.1.3. Conservation de l'extrait enzymatique	18
II.1.4. Détermination de Km et de Vm	18
II.2. Protéine phosphatase de moules	19
III. Protocole pour le dosage de l'acide okadaïque	21
III.1. Dosage par inhibition des protéines phosphatases	21
III.1.1. La gamme d'étalonnage	21
III.1.2. Préparation et incorporation des échantillons	22
III.1.3. Préparation des milieux d'essai	22
III.1.4. Le dosage sur microplaque	22
III.1.5. Modifications apportées	23
III.1.6. Traitement des données	23
III.2. Dosage par C.L.H.P.	24

RESULTATS ET DISCUSSION	25
I. Comparaison des extractions des PP2A	25
II. Etalonnage	25
II.1. Détermination des vitesses enzymatiques de la gamme	25
II.2. Variances de la droite d'étalonnage	28
II.3. Reproductibilité	29
III. Les échantillons	29
III.1. Analyses des échantillons	29
III.2. Intervalle de confiance du résultat d'analyse	30
III.3. Reproductibilité	32
III.4. Corrélation avec la C.L.H.P.	32
CONCLUSION	35
BIBLIOGRAPHIE	36
ANNEXE	

Définition des abréviations

ADAM :	9-Anthryldiazométhane
AO :	Acide okadaïque
ATP :	Acide tri-phosphate
BSA :	Sérum Albumine Bovine
C.L.H.P. :	Chromatographie Liquide Haute Performance
DO :	Densité Optique
DTT :	Dithiothréitol
EDTA :	Ethylene Diamine Tétracetic Acid
EGTA :	Ethylene Glycol-bis-(β -aminoethyl Ether) Tétracetic Acid
E_t :	Concentration en enzyme totale
HP :	Hépatopancréas
I_t :	Concentration totale de l'inhibiteur (acide okadaïque)
K_i :	Constante d'affinité vis à vis de l'inhibiteur
K_m :	Constante de Michaelis
P_i :	Phosphate inorganique
PMSF :	Phenyl Methyl Sulfonyl Fluorure
pNP :	Paranitrophényl
pNPP :	Paranitrophénylphosphate
PP :	Protéine phosphatase
PP2A :	Protéine phosphatase 2A
V_i :	Vitesse de la réaction en présence de l'inhibiteur
V_m :	Vitesse maximale de la réaction enzymatique
V_o :	Vitesse de la réaction en présence de l'inhibiteur

Présentation de l'IFREMER

L'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER) est un établissement public à caractère industriel et commercial (EPIC) qui travaille exclusivement dans le domaine marin pour accomplir plusieurs missions :

- ♦ mener des recherches à caractère fondamental dans des disciplines aussi variées que les géosciences, la microbiologie, l'halieutique, la chimie, la toxicologie, l'océanographie physique, la biologie des organismes marins ;
- ♦ assurer le suivi des ressources halieutiques et aquacoles et de leur exploitation :
 - établissement d'un diagnostic de l'état des principaux stocks exploitables par les flottes de pêche française ;
 - contrôle de la qualité du milieu et des cheptels pour l'activité aquacole ;
 - contribution à la protection de l'environnement littoral ;
 - mise au point des techniques d'élevage et de culture d'animaux et de végétaux marins ;
- ♦ réaliser des travaux dans les technologies de bases (acoustique, hydrodynamique, matériaux) ;
- ♦ construire, programmer et mettre en oeuvre la flotte océanographique hauturière et des moyens lourds associés.

L'IFREMER dont le siège est à Issy-les-Moulineaux, est structuré autour de cinq directions opérationnelles pour l'aspect thématique. La Direction des Ressources vivantes (DRV), la Direction de l'Environnement et de l'aménagement Littoral (DEL), la Direction des Recherches Océaniques (DRO), la Direction de l'Ingénierie de la Technologie et de l'Informatique (DITI) et la Direction des moyens et opérations navales. L'institut s'appuie sur cinq centres de recherche situés à Brest, Nantes, Toulon, Boulogne et Tahiti.

Des stations côtières sont rattachées aux différents centres selon leur situation géographique. Elles sont le lieu d'études à caractère régional et appliqué. Elles exercent des missions de service public, d'assistance aux professionnels, d'appui à l'administration, de conseil aux collectivités locales, d'aide à la décision en matière d'aménagement. Elles ont en charge, entre autres, la réalisation des trois réseaux de surveillance qui ont pour objet le suivi et le contrôle de la qualité des eaux littorales et des produits qui en sont issus. Ce sont :

- le Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin (RNO) qui mesure les paramètres physico-chimiques dans l'eau et plusieurs contaminants chimiques dans la matière vivante ;
- le Réseau Microbiologique (REMI) qui surveille la qualité bactériologique des eaux littorales, particulièrement celles des zones conchylicoles ;
- le Réseau PHYplancton (REPHY) qui assure un suivi des algues phytoplanctoniques, notamment des espèces toxiques pour la vie marine ou le consommateur des coquillages.

C'est dans le cadre du soutien à ce dernier réseau que se situe l'objectif de mon travail. En effet, j'ai effectué un stage d'une durée de six mois au sein du laboratoire Phycotoxines et Nuisances qui appartient à la DEL et qui est dirigé par M. LASSUS P.. L'équipe de recherche est constituée de cinq cadres chercheurs et de six techniciens. Les

études effectuées portent sur l'origine et le devenir des toxines produites par les microalgues marines. Cette thématique comprend :

- la connaissance des algues et toxines impliquées ;
- la recherche des causes de variations du contenu toxinique des algues productrices et des coquillages contaminés ;
- la connaissance des mécanismes de bioaccumulation/élimination des toxines chez les mollusques ;
- l'identification de nouveaux composés toxiques dans les coquillages (liés ou non aux phycotoxines) ;
- l'apport d'un soutien aux laboratoires côtiers dans le cadre du REPHY : développements méthodologiques, expertise ;

Le laboratoire participe, entre autres, au Programme National sur les Efflorescences Algales Toxiques (PNEAT) pour les recherches concernant les toxines diarrhéiques produites par *Dinophysis spp* et *Prorocentrum lima*, ainsi que pour les toxines paralysantes synthétisées par *Alexandrium spp*. Dans ce programme, les activités concernent l'amélioration des techniques de détection (C.L.H.P., immunotests, cytotoxicité, tests enzymatiques), l'origine des toxines, les causes des variations de toxicité, la biotransformation des toxines dans les coquillages et l'écophysiologie des bivalves contaminés.

Introduction

Il existe dans le phytoplancton marin, quelques espèces de microalgues toxiques qui présentent un risque pour la santé publique. Lorsque ces algues prolifèrent en zone côtière, les coquillages filtreurs (moules, huitres, palourdes, coquilles St Jacques,...), qui se nourrissent de ce phytoplancton deviennent impropres à la consommation.

En France, le problème majeur est posé par un dinoflagellé du genre *Dinophysis* spp qui produit une famille de toxines provoquant des gastro-entérites plus ou moins graves selon le niveau d'accumulation.

En plus du problème de santé humaine, les dommages économiques provoqués par une consommation locale et une exportation restreinte des produits de la mer peuvent être considérables (HALLEGRAEFF, 1993 ; DALZELL, 1994). L'impact économique peut alors se chiffrer à plusieurs millions de francs par épisode, selon son étendue et sa durée.

En 1983, la France a connu des cas d'intoxications diarrhéiques (3300) consécutifs à la consommation de moules, essentiellement en Bretagne Sud. Depuis cette époque, l'IFREMER a mis en place un réseau de surveillance du phytoplancton (REPHY) pour la protection des consommateurs.

Le test de référence du REPHY, pour la détection de ces toxines, est un test de létalité sur souris adultes. Il est peu sensible, non spécifique et contraire à la réglementation européenne qui vise à diminuer, voire interdire dans ce cas, l'utilisation d'animaux de laboratoire.

Par conséquent, la mise en place d'autres moyens de détections (biochimiques, biologiques) des toxines diarrhéiques est indispensable. Ceux-ci doivent répondre à certaines exigences : rapidité, sensibilité, faible coût et facilité d'utilisation pour une application en routine. Cette recherche de nouveaux procédés de détection fait l'objet de nombreux travaux internationaux.

Ainsi l'objectif de mon stage a été d'étudier la validité d'un dosage biochimique des toxines diarrhéiques par inhibition des protéines phosphatases (PP). Ce dosage est basé sur la propriété qu'à l'acide okadaïque (AO), qui est la toxine majeure produite par *Dinophysis* en France, d'inhiber l'activité de certaines protéines phosphatases.

Dans un premier temps, nous parlerons brièvement des phénomènes de prolifération d'algues toxiques, de l'algue, des toxines responsables (AO et dérivés), et des protéines phosphatases. Puis, dans un second temps, nous exposerons les travaux expérimentaux.

De plus, durant mon stage effectué au laboratoire, j'ai eu la possibilité de participer à une campagne de recherche en mer sur le navire océanographique "LE SUROIT". Il s'agissait de la dernière campagne d'une série de trois campagnes menées dans le cadre du Programme National : Efflorescences Algales Toxiques. Le sujet était l'étude des événements toxiques provoquant des intoxications diarrhéiques chez les consommateurs de coquillages. Il faut effectuer des prélèvements *in situ* de *Dinophysis*, pour étudier sa toxicité car cette espèce n'est actuellement pas cultivable. Les objectifs de ces campagnes étaient nombreux :

- Description de la distribution géographique de cette espèce
- Etude concernant l'algue et sa physiologie.
- Confinement hydrodynamique des populations.
- Etude de la toxicité des algues sur des moules immergées.

I. Les phénomènes d'efflorescence algales

Les efflorescences algales sont à l'origine du phénomène des "eaux colorées", dues à la présence en forte concentration de microalgues toxiques comme *Alexandrium minutum* et *Gymnodinium cf. nagasakiense*. Sur les 5 000 espèces phytoplanctoniques marines, environ 300 peuvent être associées au phénomène d'eaux rouges alors que seulement 40 espèces environ ont la capacité de produire des toxines. Celles-ci sont soit directement toxiques pour les organismes marins, soit toxiques pour l'homme via les coquillages sans effet sur ces derniers (HALLEGRAEFF 1993, SOURNIA, 1995).

Le phénomène d'efflorescence algale est un phénomène naturel qui survient au printemps et durant l'été. Les facteurs contrôlant le développement des espèces toxiques en zone côtière sont mal connus.

Les intoxications résultant de la prolifération de certaines espèces algales ont été regroupées en cinq classes suivant leurs signes cliniques :

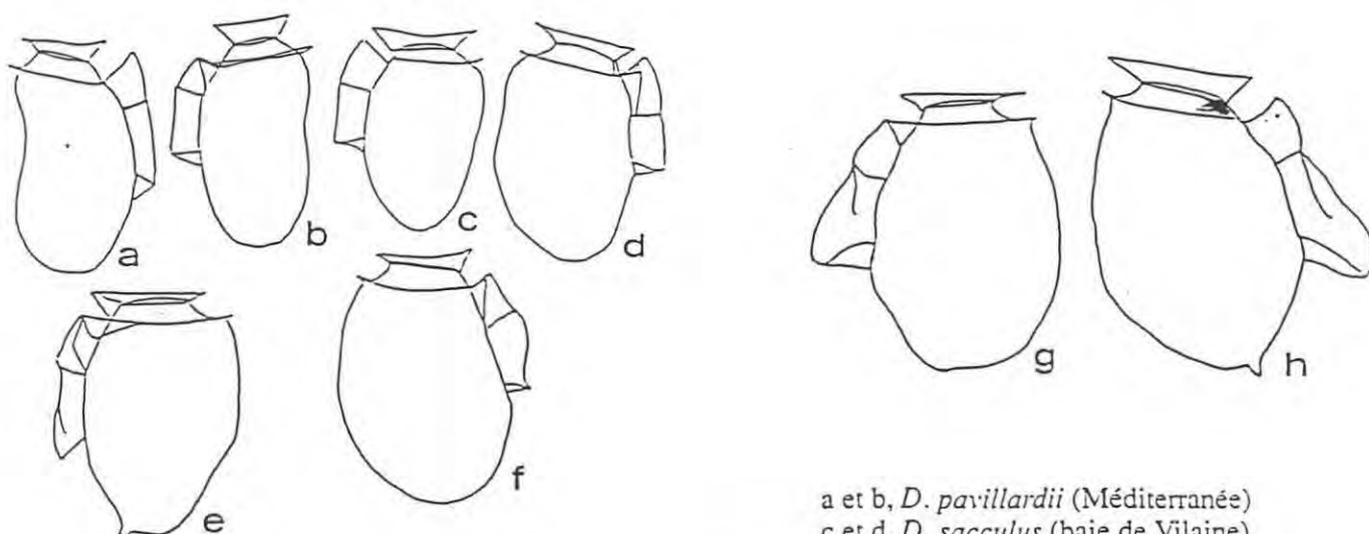
- Les Intoxications Amnésiques par les Fruits de Mer (I.A.F.M.), ou A.S.P (Amnesic Shellfish Poisoning), sont provoquées par une neurotoxine, l'acide domoïque produit par des diatomées du genre *Pseudo-nitzschia*.
- Les Intoxications Paralytiques par les Fruits de Mer (I.P.F.M.), ou P.S.P. (Paralytic Shellfish Poisoning), sont provoquées par la saxitoxine et ses dérivés (néosaxitoxine et gonyautoxines), produites principalement par des dinoflagellés du genre *Alexandrium*.
- Les Intoxications Neurologiques par les Fruits de Mer (I.N.F.M.), ou N.S.P. (Neurotoxic Shellfish Poisoning), sont provoquées par des brevetoxines produites par un dinoflagellé du genre *Ptychodiscus*.
- Les Intoxications de type Ciguatérique ou CFP (Ciguarectic Fish Poisoning) sont des intoxications neurologiques et gastro-intestinales. Les toxines en cause sont la maïtoxine et les ciguatoxines, produites par un dinoflagellé du genre *Gambierdiscus*.
- Les Intoxications Diarrhéiques par les Fruits de Mer (I.D.F.M.), ou D.S.P. (Diarrheic Shellfish Poisoning), sont provoquées par des dinophysistoxines de type acide okadaïque (AO) et ses dérivés, produites principalement par les dinoflagellés des genres *Dinophysis* et *Prorocentrum*.

II. Intoxications Diarrhéiques par les Fruits de Mer (I.D.F.M.)

II.1. Les algues

Les dinoflagellés associés à ce type d'intoxication appartiennent à deux genres ubiquistes : *Dinophysis* et *Prorocentrum*. Ils ne provoquent pas de phénomènes d'eaux colorées car leur concentration dans le milieu n'excède pas 10 à 100 000 cellules par litre, au regard de celle observée en cas de bloom : plusieurs millions de cellules par litre.

Le genre *Dinophysis*, qui est la cause majeure en France, fait partie de la classe des Dinophycées, de l'ordre des Dinophysale et de la famille des Dinophysaceae. La figure 1 présente les espèces de *Dinophysis* des côtes françaises.



a et b, *D. pavillardii* (Méditerranée)
c et d, *D. sacculus* (baie de Vilaine)
e, *D. acuminata* (Charente-Maritime)
f, *D. cf. acuminata* (port d'Antifer)
g et h, *D. cf. norvegica* ? (baie de Vilaine)
Dessins inédits de E. BALECH

Figure 1 : *Dinophysis* des côtes françaises (d'après SOURNIA, 1991)

II.2. Les symptômes

Les principaux symptômes sont du type gastro-intestinal (diarrhée, vomissement, nausées, douleurs abdominales) accompagnés de fièvre, de migraine, de brûlure d'estomac, de frissons, de maux de tête (YASUMOTO *et al.*, 1984). L'absence de trouble neurologique, l'apparition rapide des symptômes et la stabilité à la chaleur implique qu'il ne s'agit pas d'intoxication paralytique ni d'infection bactérienne (HUNGERFORD et WEKELL, 1992). Les symptômes apparaissent au bout de 30 minutes à 12 heures après consommation des coquillages contaminés, 70 % des patients les développant en 4 heures. Les troubles persistent pendant 3 jours dans le cas les plus sévères et ce sans effet ultérieur. Leur durée semble dépendre de la quantité de toxine ingérée.

II.3. Les toxines

La prolifération de *Dinophysis* est associée à trois familles de toxines : les Dinophysistoxines (DTX), les Yessotoxines (YTX) et les Pectenotoxines (PTX). Mais seules les Dinophysistoxines sont responsables des gastro-entérites. La toxicologie des autres toxines est encore mal connue.

Les Dinophysistoxines sont constituées d'une famille de molécules dont le squelette est un polyéther d'acide gras en C₃₈ (fig. 2). L'acide okadaïque (AO) a été d'abord isolé à partir d'une éponge *Halinchondria okadaï* provenant de la côte pacifique du Japon et de l'espèce *H. melanodocia* de la côte de Floride (TACHIBANA, 1981). Par la suite il a été isolé à partir du dinoflagellé marin *Prorocentrum lima* (MURAKAMI *et al.*, 1982).

L'acide okadaïque (AO) possède plusieurs dérivés. Les principaux sont la DTX-1, la DTX-2 et la DTX-3 (YASUMOTO *et al.*, 1985). Les dérivés de l'acide okadaïque sont des composés moyennement polaires. Pour les échantillons de coquillages européens (France, Suède, Hollande, Espagne), la toxine principale est l'AO (KUMAIGAI *et al.*, 1986).

On ne connaît pas encore exactement les transformations éventuelles de ces toxines sous l'effet de certains facteurs. Cependant, nous pouvons affirmer que l'acide okadaïque n'est pas détruit par la chaleur puisque des hépatopancreas portés à ébullition pendant 163 minutes conservent une teneur en AO de moitié (EDEBO *et al.*, 1988). Puisque les toxines se concentrent principalement dans les glandes digestives, seule l'élimination de celles-ci, avant consommation, permet d'éviter les intoxications (YASUMOTO *et al.*, 1984). Les toxines provoquent une accumulation de fluide dans l'intestin grêle en agissant sur la perméabilité vasculaire.

L'AO n'est pas seulement responsable des diarrhées, en effet des travaux récents ont montrés que l'AO possède une activité de promotion tumorale par son pouvoir inhibiteur des PP (BIALOJAN et TAKAI, 1988 ; FUJIKI, 1987). Par le même mécanisme, l'AO agit également comme un agent contracturant des muscles lisses dans les artères ombilicales humaines (SHIBATA, 1982). En effet, la contraction des muscles lisses dépend de l'état de phosphorylation de la myosine (OZAKI 1987a,b).

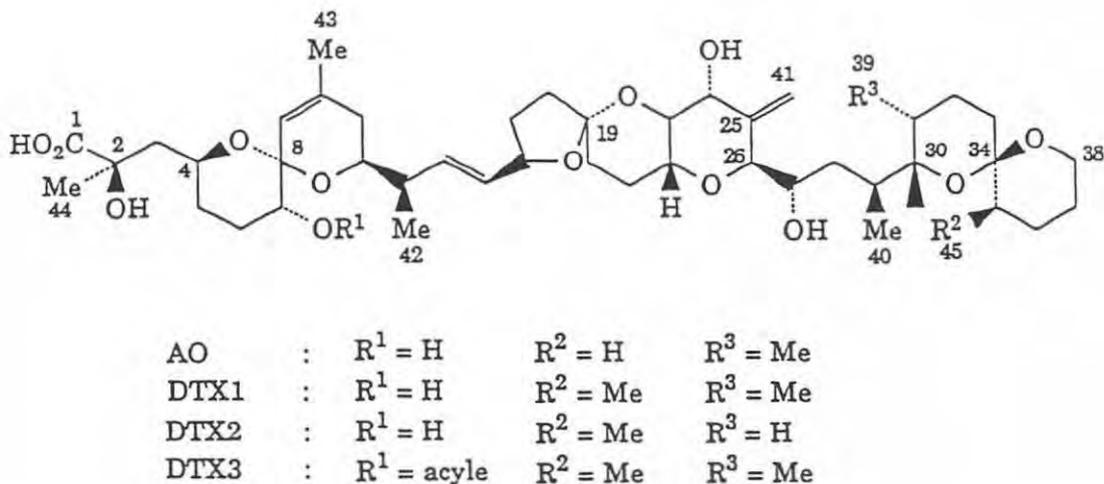


Figure 2 : AO et DTX isolés des coquillages contaminés par *Dinophysis sp.*

II.4. Les méthodes de détection des toxines diarrhéiques

Diverses méthodes s'appuyant sur différentes disciplines permettent la détection des DSP.

II.4.1. Les méthodes biologiques

Le test souris

Il s'agit de la méthode de détection des toxines la plus utilisée. Elle fut développée au Japon par YASUMOTO *et al.* en 1978. Au cours de ce test, les extraits sont injectés par voie intrapéritonéale à des souris mâles de 20 g. La quantité minimale de glandes digestives (sous forme d'extrait) nécessaire pour tuer une souris en 24 h est considérée comme 1 US (Unité Souris). La dose létale 24 heures de l'AO est de 4 µg selon YASUMOTO (1980). Actuellement ce test, qui a été simplifié, est le test de référence utilisé dans les laboratoires pour la surveillance des coquillages (MARCAILLOU-LE BAUT, 1985).

Les tests de cytotoxicité

De nombreux tests de cytotoxicité ont été étudiés dont les principaux sont le test D.R.A.M.E. et le test sur les hépatocytes.

Le test D.R.A.M.E

Le Dosage Rapide de l'Acide okadaïque dans les Moules après Extraction (D.R.A.M.E.), mis au point par AMZIL *et al.* (1992), utilise les propriétés cytotoxiques de l'AO et ses dérivés. Il est basé sur l'observation de la modification rapide (3 à 4 heures) de cellules KB exposées à l'AO. Ceci permet de déterminer la concentration minimale active (C.M.A.) d'extrait de glandes digestives provoquant un arrondissement visible des cellules traitées. Le seuil de détection de la méthode est de 1,25 µg d'AO par ml. Il s'agit d'un test de dosage des inhibiteurs des protéines phosphatases liposolubles du type acide okadaïque.

Le test de cytotoxicité sur hépatocytes

Ce test est basé sur la cytotoxicité des toxines DSP vis-à-vis d'hépatocytes de rat fraîchement préparés. L'action cytotoxique se traduit, après 2 heures d'incubation, par une modification de la morphologie des cellules avec la libération d'une enzyme, la lactate déshydrogénase, dans le milieu (AUNE, 1989). Le seuil de détection est de 1µg/ml. Son inconvénient majeur est l'utilisation d'animaux vivants.

Les tests immunologiques

Ces méthodes utilisent des anticorps monoclonaux anti-AO préparés soit à partir de lapin (LEVINE, 1988), soit à partir de souris (USUGAWA, 1989). Les tests ELISA utilisés sont simples et rapides et permettent d'obtenir des seuils de détection de 50 à 100 ng/g d'hépatopancréas (UDA 1989, TUBARO 1992). Pour la plupart il s'agit de méthodes en cours de développement.

II.4.2. Les méthodes physico-chimiques

La méthode la plus utilisée est l'analyse par Chromatographie Liquide Haute Performance (C.L.H.P.), mis au point par LEE *et al.* (1987) et STABELL (1991), dose l'AO par fluorimétrie après dérivation par le 9-Anthryldiazométhane (ADAM). Cette méthode est sensible, spécifique de l'AO, mais elle est difficile, longue et l'agent de dérivation est instable. Néanmoins, elle sert de référence pour les dosages précis des teneurs en acide okadaïque (AMZIL, 1993).

III. Les phosphatases

Les phosphatases sont des phosphotransférases qui catalysent le transfert de groupe phosphoryl d'un acide aminé de l'extrémité d'une chaîne protéique. Elles scindent une liaison ester phosphorique (notamment dans le métabolisme des glucides), à partir de substrats très variés et libèrent ainsi de l'acide phosphorique. Leur spécificité n'est donc pas très étroite, mais leur pH optimum d'action diffère selon l'origine organique de l'enzyme. Bien que ces enzymes peuvent déphosphoryler les phosphoprotéines, elles sont présentes seulement dans les espaces extracellulaires ou dans des compartiments intracellulaires spécialisés (appareil de Golgi, vésicules du réticulum endoplasmique). Nous les retrouvons, en particulier dans les zones de croissance des os, la muqueuse intestinale, le cortex rénal, les glandes mammaires, le foie, le cerveau, les leucocytes et le tissu lymphoïde.

Les phosphatases alcalines sont des phosphomonoestérases de type I dont l'activité se manifeste entre pH 7,5 et pH 9,6. Ce sont des glycoprotéines. Les phosphatases acides sont des phosphomonoestérases de type II dont l'activité se manifeste entre pH 4,5 et pH 6. Un mécanisme de régulation fondé sur la phosphorylation des enzymes n'est convenable que si il est réversible, c'est à dire que l'action des phosphatases est contrebalancée par celle des kinases. Il faut noter que la phosphatase est une enzyme très puissante agissant beaucoup plus vite que ne le fait la kinase (PELMONT, 1993). La figure 3 présente la phosphorylation protéique réversible.

Les phosphatases interviennent dans tous les métabolismes de phosphorylation/déphosphorylation des protéines des cellules eucaryotes comme la glycolyse, la glucogenèse, la synthèse des acides gras et du cholestérol, le transfert des acides aminés. L'inhibition des protéines phosphatases par l'acide okadaïque engendre des perturbations de ces métabolismes.

Les protéines phosphatases comprennent plusieurs sous-unités enzymatiques de type I, 2A, 2B, 2C. La PP2A possède l'activité spécifique la plus importante vis à vis du paranitrophénylphosphate (pNPP). De plus elle est fortement inhibée par l'acide okadaïque. C'est pourquoi, elle a été retenue pour le dosage de l'AO dans les glandes digestives (hépatopancréas) des moules.

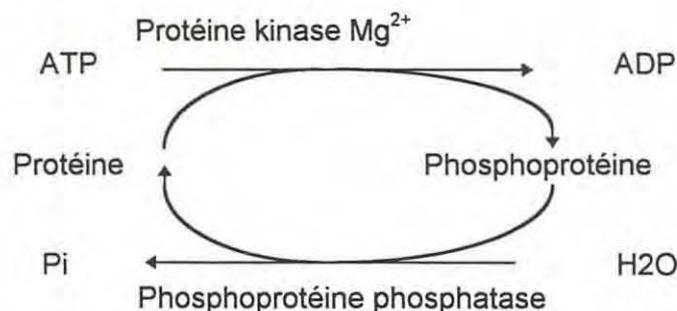


Figure 3 : Phosphorylation protéique réversible

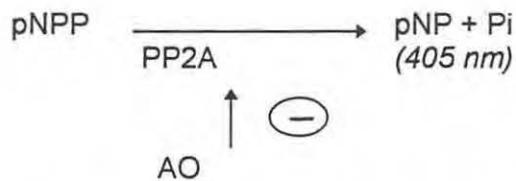
METHODOLOGIE

Avant de développer la méthodologie, nous présentons le principe et les paramètres cinétiques de la réaction enzymatique.

Principe

Le principe du dosage repose sur l'inhibition de la protéine phosphatase 2A par l'acide okadaïque.

Les protéines phosphatases sont capables de déphosphoryler des substrats protéiques et non protéiques comme le paranitrophénylphosphate (pNPP) (TAKAI et MIESKES, 1991).



La méthode permet de doser l'AO dans des glandes digestives de moules contaminées en mesurant le taux d'inhibition de l'activité phosphatasique sur le pNPP. Ce dernier, incolore, devient jaune après sa déphosphorylation. La quantité de produit formé est mesurée par colorimétrie à 405 nm. La réaction s'effectue à pH 8,5 et à 30 °C.

Paramètres cinétiques

L'acide okadaïque est un inhibiteur non compétitif (BIALOJAN, 1988), c'est à dire qu'il se fixe indépendamment du substrat, et que le site de fixation de l'inhibiteur est différent du site de fixation du substrat. L'affinité de l'inhibiteur pour l'enzyme est grande puisque son K_i est extrêmement faible ($K_i = 30 \text{ pM}$) (TAKAI et MIESKES, 1991). Dans nos conditions expérimentales où $E_t/K_i > 0.01$ déterminées par SIMON et VERNOUX (1994) (E_t : concentration en enzyme totale), le modèle cinétique de Michaelis et Menten n'est pas valable. Cependant, on peut utiliser un modèle cinétique général (HENDERSON, 1972).

Si V_o et V_i sont respectivement la vitesse initiale de la réaction en l'absence et en présence de l'inhibiteur et E_t et I_t sont respectivement la concentration de l'enzyme et de l'acide okadaïque (AO), nous obtenons l'équation suivante où V_i/V_o est l'activité relative théorique de l'enzyme :

$$E_t \left(\frac{V_i}{V_o} \right)^2 + (I_t - E_t + K_i) \frac{V_i}{V_o - K_i} = 0$$

dont la solution est égale à

$$\frac{V_i}{V_o} = \frac{(E_t - I_t - K_i) + \sqrt{(E_t - I_t - K_i)^2 + 4E_t K_i}}{2E_t}$$

I. Obtention des extraits de moules

I.1. Origine

Les échantillons de moules sont issus de différentes régions de la France :

- Etangs de Salses et de Leucate de la région de Montpellier
- Baie de Seine : Octeville, Semoy
- Arcachon, Cap Ferret, Banc d'Arguin,
- La Tremblade, Le Croisic

I.2. Principe d'extraction de l'acide okadaïque

L'extraction de l'acide okadaïque suit le protocole d'extraction de LEE (1987) pour le dosage chimique (fig. 4). Les moules sont décoquillées afin de récupérer les hépatopancréas qui concentrent les toxines. Les hépatopancréas broyés à l'ultraturax sont homogénéisés avec un mélange méthanol/eau (80/20). Un partage liquide/liquide avec de l'hexane, permet de récupérer les composés apolaires (acides gras, dérivés acylés de l'acide okadaïque comme la DTX-3,...). La polarité de la phase méthanolique est augmentée par addition d'eau, pour obtenir un mélange méthanol/eau 70/30 suivi d'un partage liquide/liquide avec le chloroforme. Cette étape d'extraction permet de séparer les composés fortement polaires qui restent dans le méthanol et les composés très peu polaires, comme l'acide okadaïque, qui se concentrent dans le chloroforme. La phase chloroforme est complétée à 10 ml puis séchée au sulfate de sodium.

Le chloroforme (CHCl_3) a été remplacé par le dichlorométhane (CH_2Cl_2). En effet ce dernier permet d'obtenir les mêmes résultats tout en étant moins toxique que le CHCl_3 (AMZIL, 1993).

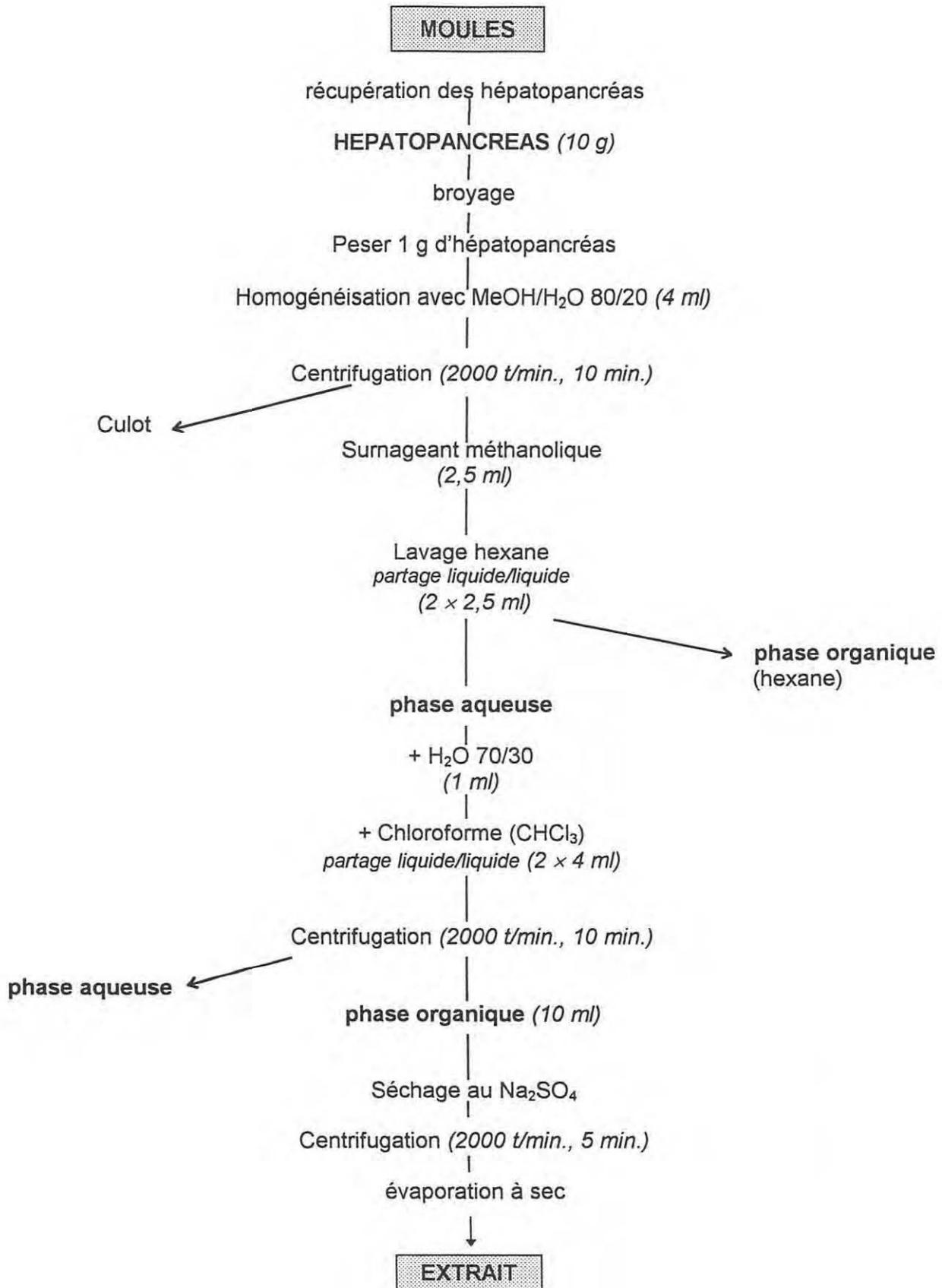


Figure 4 : Méthode pour la préparation des extraits de moules

II. Obtention de la protéine phosphatase

La PP2A du commerce n'est pas utilisable car elle ne donne pas de bons résultats (Equipe de TRUCHAULT, Faculté de pharmacie de Nantes). Nous avons alors utilisé de la PP2A obtenue à partir de muscle de lapin et à partir de chair de moules, dans le but de choisir une méthode d'extraction qui soit à la fois rapide, simple, peu coûteuse et permettant d'obtenir des protéines phosphatases d'un degré de pureté satisfaisant.

II.1. Protéine phosphatase de lapin

II.1.1. Extraction de la protéine phosphatase 2A (PP2A)

L'extraction de la PP2A à partir de muscle de lapin suit la méthode de COHEN *et al.*, (1988), elle utilise les techniques habituelles de séparation et de purification des protéines (fig. 5). Cette méthode a été appliquée au laboratoire de Caen par M. VERNOUX et M. SIMON (1994). Pour des raisons de coûts, de temps et de stabilisation de l'enzyme, quelques étapes de purifications ont été supprimées. Une partie de leur extrait enzymatique a été utilisé à Nantes pour les essais de validation.

Les muscles de lapin sont prélevés, broyés et mis dans de la glace. Toutes les étapes doivent s'effectuer à 4°C pour éviter la dénaturation de la protéine phosphatase. L'homogénéisation se fait dans une solution EDTA-EGTA. L'enrichissement protéique est réalisé par des précipitations avec les sels neutres (sulfate d'ammonium) suivies d'une précipitation à l'éthanol. Ce dernier diminue la constante diélectrique du milieu, ce qui augmente les interactions entre protéines. L'extrait protéique est fractionné sur une chromatographie échangeuse d'ions (DEAE sépharose CL6B). L'élution se fait avec un gradient croissant de concentration en sel (NaCl).

II.1.2. Activité de l'extrait enzymatique

A la sortie de la colonne DEAE sépharose, des fractions de 2,6 ml sont analysées pour repérer celles qui possèdent une activité phosphatasique vis à vis du pNPP en absence et en présence d'AO. La mesure de l'activité enzymatique est effectuée selon la méthode de TAKAÏ et MIESKES (1991). L'activité pNPP-phosphatasique est déterminée à 30 °C par mesure de l'augmentation initiale de la DO à 405 nm qui traduit la dégradation de pNPP incolore en pNP (jaune). Les fractions possédant cette activité et pouvant être inhibées par l'AO sont retenues pour la suite de cette étude. Comme le montre la figure 6, les fractions de 23 à 29 possèdent ces caractéristiques. La composition du milieu d'essai de l'activité enzymatique est détaillée dans l'annexe A.

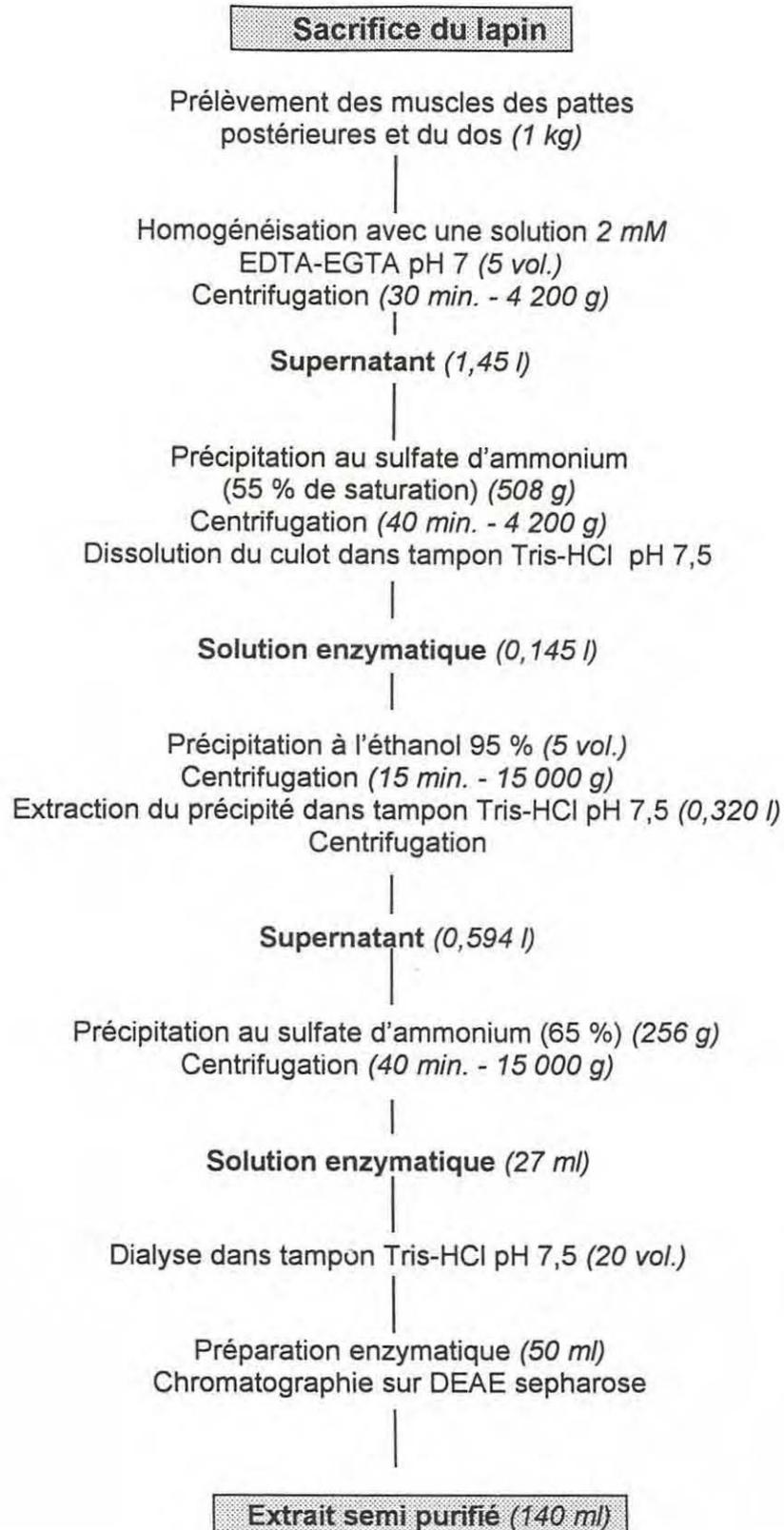


Figure 5 : Méthode de préparation d'extrait semi-purifié de PP2A et PP1C

$\Delta DO_{405 \text{ nm}}$:
production de
pNP

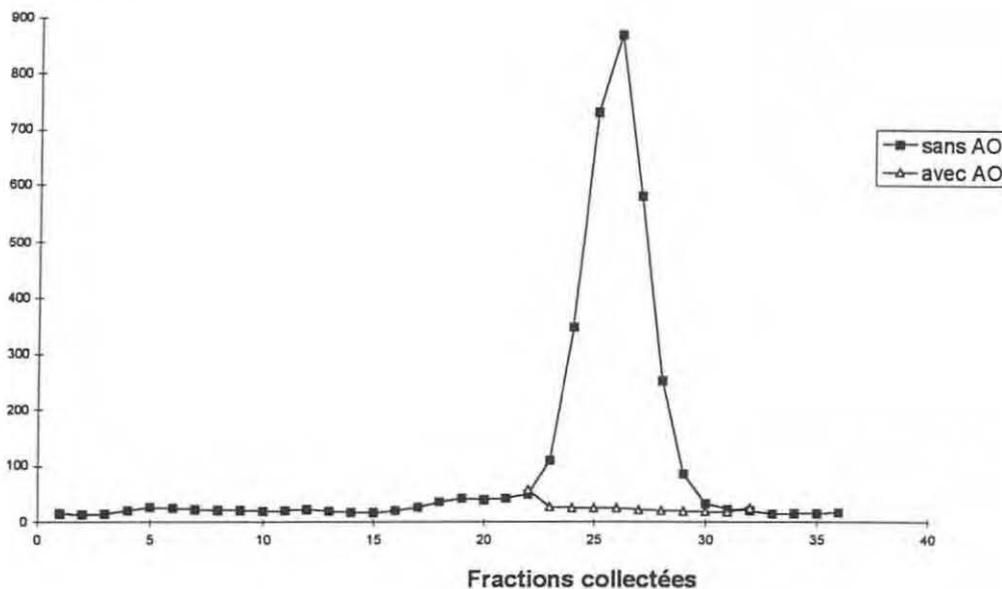


Figure 6 : Détermination des fractions à activité pNPP-phosphatasique

II.1.3. Conservation de l'extrait enzymatique

Après l'étape d'extraction, l'enzyme est conservée en solution dans le milieu suivant :

- Tris/HCl pH 7,5 20 mM
- EGTA 0,1 mM
- Glycérol 10% (v/v) en final
- Mercaptoethanol 0,1%
- Benzamidine (inhibiteur de protéases) 1 mM
- Phenyl Methyl Sulfonyl Fluorure (PMSF) 0,1 mM
- N-Tosyl-L- Phenylalanine Chloro methyl Cetone 0,1 mM
- NaCl 0,25 mM.

L'ensemble est fractionné en aliquots de 1 ml dans des tubes Eppendorff en polyéthylène de 1,5 ml et conservés au congélateur à -30°C . Dans ces conditions, l'activité enzymatique est stable pendant au moins 6 mois.

II.1.4. Détermination de K_m et de V_m

L'étude de la cinétique pNPP-phosphatasique en fonction de la concentration en substrat et en absence d'acide okadaïque permet de déterminer la Constante de Michaelis (K_m) et la vitesse maximale de la réaction enzymatique (V_m).

Pour mesurer la constante d'affinité de la PP2A, on détermine les vitesses initiales (V_i) de la réaction à différentes concentrations de pNPP ($[S]$). Cette étude est réalisée en déterminant, à l'aide d'un spectrophotomètre (405 nm), la quantité de produit pNP formé. Les différentes courbes obtenues montrent que les V_i sont constantes durant les dix

premières minutes, indépendamment de la quantité d'enzyme. La figure 7 présente $1/V_i = f(1/[S])$, de Lineweaver-Burk, qui donne l'ordonnée à l'origine $1/V_m$ ($V_m = 50$) et l'abscisse à l'origine $1/K_m$ ($K_m = 5,86$).

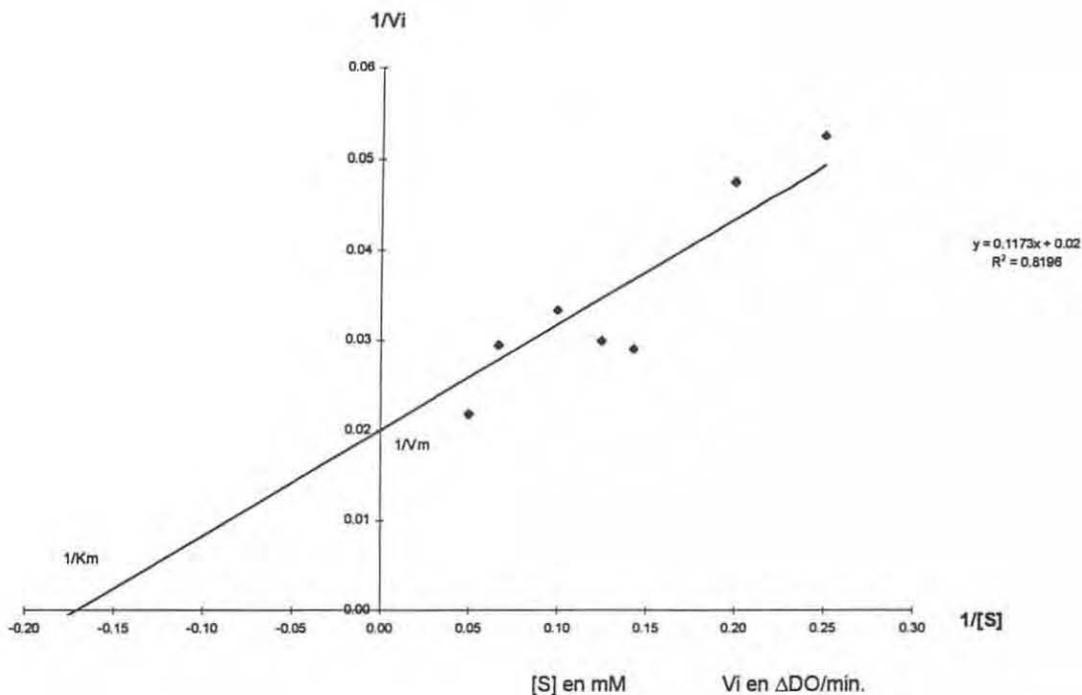


Figure 7 : Détermination de K_m et de V_m de la protéine phosphatase

Pour disposer d'une source de protéine phosphatase ne demandant pas le sacrifice d'animaux de laboratoire et éviter une extraction longue et coûteuse, nous avons mis au point, avec l'équipe de M. VERNOUX, un protocole d'extraction à partir des moules.

II.2. Protéine phosphatase de moules

L'extraction des PP2A à partir des moules est développée dans la figure 8.

Les moules non toxiques sont décoquillées pour récupérer et broyer rapidement les chairs dans du tampon d'extraction MOPS (annexe B). Après centrifugation, le surnageant est récupéré et filtré sur laine de verre afin de retenir les acides gras. Le filtrat subit une précipitation avec un mélange MeOH-PMSF suivi d'une centrifugation. Le culot est repris dans du tampon d'extraction et centrifugé. L'opération est répétée deux fois en gardant à chaque fois le surnageant. Les deux surnageants sont poolés constituant ainsi l'extrait brut, soit 60 ml issus de 10 g de moules.

La purification des PP2A de moules (annexe C), l'identification des fractions actives, leur conservation et la détermination du K_m et V_m ont été réalisées dans les mêmes conditions que pour la PP2A de lapin.

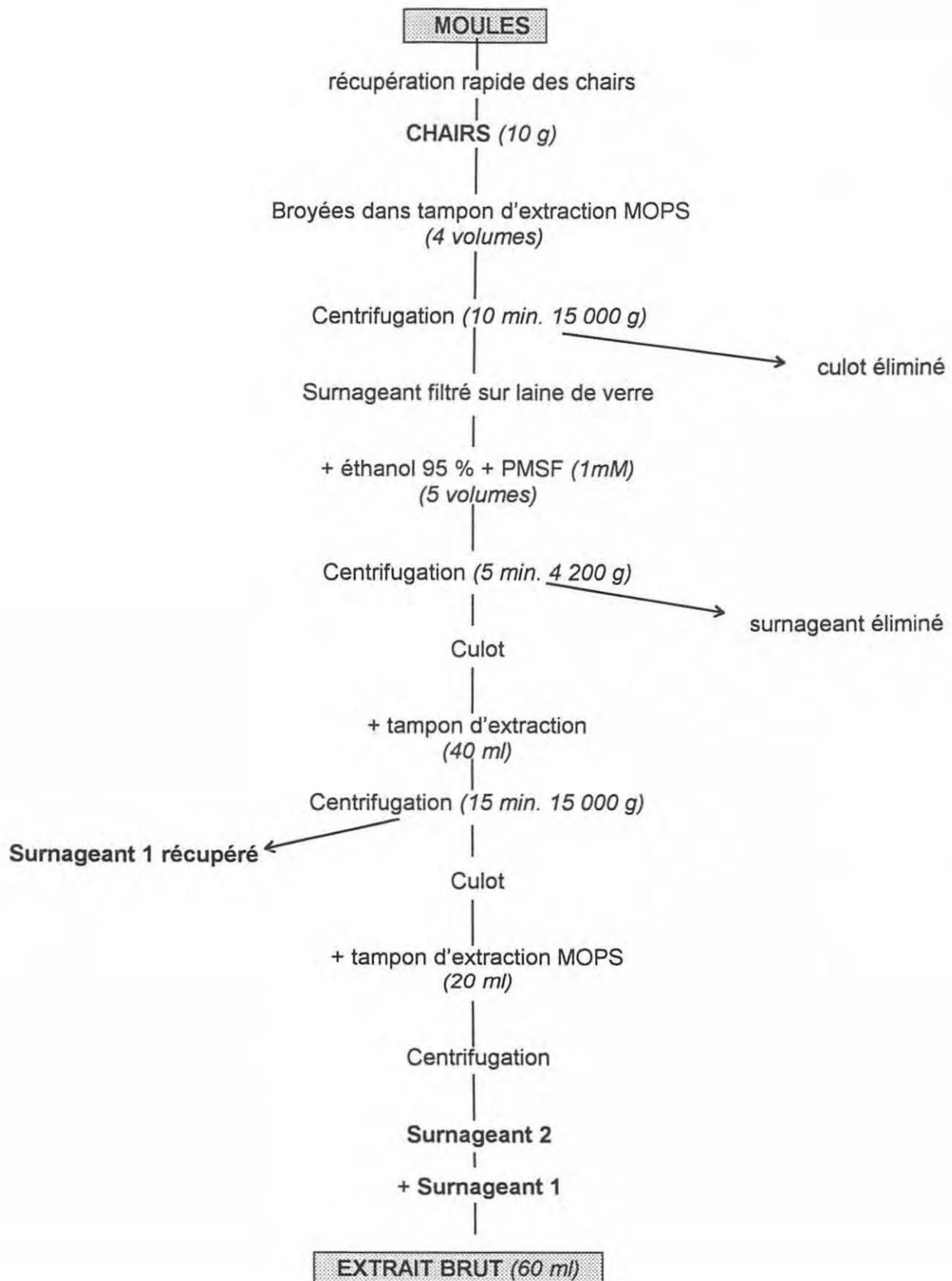


Figure 8 : Méthode pour préparer un extrait semi purifié de PP2A de moules

III. Protocole pour le dosage de l'A.O.

III.1. Dosage de l'AO par inhibition des protéines phosphatases

Dans un premier temps, nous avons déterminé les conditions expérimentales d'activité maximale de l'enzyme. Nous avons étudié l'activité de la PP2A en faisant varier la température de l'expérience de 25 à 35 °C et le pH de 6 à 9.

Les résultats obtenus ont montré que l'enzyme possède une activité maximale à 30°C et à pH 8,5 ; ce qui est en concordance avec les résultats de TAKAI et MIESKES (1991) et ceux de SIMON et VERNOUX (1994). De plus, leurs résultats indiquent que l'activité maximale est atteinte avec des concentrations en substrat supérieures à 15 nM et que l'activité pNPP-phosphatase n'est pas affectée lorsque les pourcentages finaux en méthanol sont inférieurs à 0,1 %.

III.1.1. La gamme d'étalonnage

La préparation de la gamme étalon est détaillée dans l'annexe D. Pour étudier la fiabilité du dosage, nous avons établi la courbe de l'activité pNPP-phosphatase relative en fonction de différentes quantités d'AO standard (Fig. 9). Cette expérience est pratiquée avec une plaque de microtitration, en présence de BSA et de DTT. La lecture se fait toutes les minutes, pendant 10 minutes, au spectrophotomètre à 405 nm. L'activité de référence maximale est déterminée en absence d'acide okadaïque dans le milieu réactionnel. Les résultats obtenus sur l'activité enzymatique en fonction des différentes concentrations d'AO montrent que la courbe obtenue peut être assimilée à une droite pour des concentrations allant de 0 à 0,4 ng d'AO par ml ce qui correspond à des activités relatives s'étalant de 100 % à 35 - 40 %. Mais l'expérience a montré qu'en réduisant la fourchette de V_i/V_o à 0,3 - 0,85 on supprimait certaines valeurs erratiques. De plus, dans nos conditions de travail, lorsque la régression linéaire est extrapolée jusqu'à l'axe des abscisses, elle donne la concentration en PP2A du milieu réactionnel (0,1 ng → 0,5 nM).

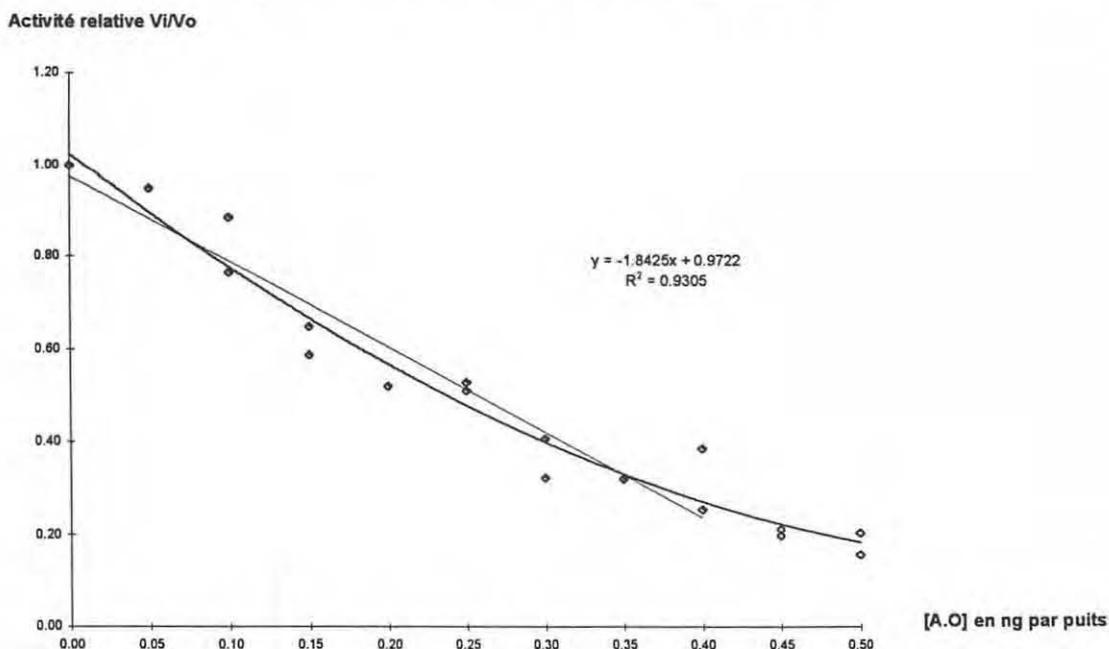


Figure 9 : Activité enzymatique relative en fonction de différentes [A.O.]

III.1.2. Préparation et incorporation des échantillons

A partir d'un extrait sec contenant 0,025 g d'hépatopancréas, repris dans du méthanol 80 % (20 µl) et du milieu de base (980 µl), nous établissons une gamme de dilution au 1/2. Pour chaque dilution, on incorpore 10 µl au niveau de la plaque de titration.

Quantité d'hépatopancréas incorporées par puits (10 µl) :

250 µg 187,5 µg 125 µg 62,5 µg 31,12 µg 15,6 µg

Dans ces conditions nous sommes sûrs d'avoir au moins une dilution qui s'intègre dans la zone de précision de la courbe étalon (0,3 -0,85 pour Vi/Vo).

III.1.3. Préparation des milieux d'essai

La préparation des milieux d'essai est donnée dans l'annexe E. Le milieu réactionnel comporte tous les composés nécessaires à la réaction enzymatique. Le Serum Albumine Bovine (BSA) "protège" la phosphatase vis à vis des protéases de l'extrait enzymatique. Statistiquement les protéases dégraderont plus la BSA que la phosphatase. Le milieu de base contient du MgCl₂ car la PP2A est ATP / Mg²⁺ dépendante. Le dithiothreitol (DTT) est un agent réducteur des groupements -SH des protéines. Il stabilise la phosphatase. Le substrat est en excès (40 mM), vis à vis de la quantité de phosphatase.

III.1.4. Le dosage sur microplaque

L'avantage de l'utilisation d'une microplaque de titration est d'avoir en même temps plusieurs cinétiques enzymatiques (96 puits). Cela permet d'établir une gamme étalon sur chaque plaque, en plus des échantillons à analyser.

Les expériences sont réalisées à température constante de 30 °C, sous une hotte chauffée. Les milieux sont incubés à cette température avant le dosage. La plaque, elle-même est à 30 °C. L'extrait enzymatique est gardé à basse température (dans de la glace) pour éviter sa dégradation.

L'incorporation des échantillons est représentée dans l'annexe F. Le mélange BSA-DTT (10 µl) est incorporé en premier dans les puits, suivi des solutions à tester (10 µl) : AO standard pour la gamme étalon, ou extrait d'hépatopancréas de moules. L'extrait enzymatique est sorti au dernier moment du froid et incorporé dans les puits (10 µl par puits). Avant de mettre le substrat (100 µl de pNPP) dans le milieu, il faut laisser l'inhibiteur (AO) "s'accrocher" sur le site d'inhibition de l'enzyme (PP2A), puisqu'il s'agit d'une inhibition non compétitive.

La plaque est aussitôt transférée dans le lecteur de microplaque pour une lecture de la cinétique sur 10 minutes. Ce temps permet d'être dans la partie linéaire de la courbe cinétique.

L'utilisation d'un lecteur de microplaque de type Dynatech MR5000 permet de mesurer l'absorbance des solutions contenues dans des puits à fond plat. Il possède un temps de lecture relativement court ce qui permet de faire des cinétiques rapides de manière reproductible. Les puits périphériques de la plaque peuvent être utilisés au même titre que les autres puits de la plaque. Les résultats du lecteur sont analysés par ordinateur.

III.1.5. Modifications apportées

Afin de réduire les sources d'erreurs dues à l'expérimentation, plusieurs modifications ont été apportées sur le travail de paillasse :

- Usage d'une pipette Easy-Step précise pour les petits volumes (10 μ l), d'un emploi facile et rapide. La BSA est très visqueuse et entraîne la formation de bulles. Une bonne utilisation de l'Easy-Step permet d'éviter ce problème.
- Réductions des variations de températures en travaillant sous hotte chauffée. En effet l'emploi d'une étuve sur la paillasse entraîne des diminutions de la température des réactifs, la réaction ne se fait donc plus à 30 °C.
- Augmentation du temps d'incubation de l'inhibiteur avec l'enzyme, avant l'incorporation du substrat. Ce temps était fixé à 4 minutes, nous l'avons prolongé à 10 minutes, cette durée permet à l'enzyme d'atteindre sa température d'activité maximale.
- Une homogénéisation à l'obscurité pendant le contact enzyme-inhibiteur permet un mélange des solutions.

Un témoin négatif, indispensable pour le calcul des activités relatives, est caractérisé par l'inhibition totale de la phosphatase. Celle-ci est atteinte par la présence de 100 nM d'AO. Dans notre cas, l'absence de phosphatase dans le milieu réactionnel est assimilée à une inhibition totale. Le témoin positif, où l'activité de la phosphatase est maximale, est caractérisé par un milieu réactionnel sans AO.

Dans ces deux cas, le volume de phosphatase ou d'AO est remplacé par un volume de mélange BSA-DTT.

III.1.6. Traitement des données

Les données transmises par le lecteur de plaque sont stockées dans un fichier de type texte (TXT). Il s'agit des valeurs brutes de densité optique mesurées à 405 nm, prises à 10 temps différents (0 à 9). Pour un temps donné, il y a 96 mesures qui correspondent aux 96 puits de la plaque. Un programme de transfert permet de regrouper les 10 valeurs se rapportant à un seul puits. Nous obtenons donc pour chaque puits la cinétique enzymatique d'apparition du pNP.

Pour déterminer les activités relatives de chaque milieu réactionnel, les valeurs de DO sont intégrées dans une feuille de calcul Excel (version 5). A l'aide de la gamme étalon réalisée dans les mêmes conditions expérimentales que les échantillons, on peut déterminer la quantité de toxine inhibant les phosphatases. Connaissant la quantité d'hépatopancréas par puits, nous pouvons rapporter la quantité de toxine par gramme d'hépatopancréas.

III.2. Dosage par Chromatographie Liquide Haute Performance (C.L.H.P.)

L'analyse par C.L.H.P. a été mise au point par LEE en 1987, il s'agit d'une détection de l'AO après couplage de celui-ci avec un chromophore : le 9-anthryldiazométhane (ADAM). La limite de détection de l'acide okadaïque est de 1 ng.

- L'extrait sec d'hépatopancréas est repris par 100 µl d'une solution méthanolique à 0,1 % d'ADAM, la réaction s'effectue pendant toute une nuit à l'obscurité et à température ambiante.

- Le produit obtenu après dérivation est purifié sur une cartouche de silice :

L'extrait dérivé est repris dans 1 ml d'un mélange $\text{CHCl}_3/\text{C}_6\text{H}_{14}$ (50/50) et est déposé sur la silice, lavée avec 5 ml de ce même solvant. L'élution est effectuée avec 5 ml des mélanges suivants : $\text{CHCl}_3/\text{C}_6\text{H}_{14}$ (50/50), Chloroforme 100 %, $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (95/5). Les 9-anthrylméthyl esters d'acide okadaïque et de DTX-1 sont élués dans la dernière fraction qui est mise à sec et puis analysée en C.L.H.P.. Les extraits sont repris dans 100 µl de méthanol dont 10 µl sont injectés.

- L'analyse chromatographique est réalisée sur une chaîne CLHP isocratique équipée d'une colonne phase inverse C_{18} Lichrospher 4 µm, la colonne est thermostatée à 35 °C. Le solvant d'élution est un mélange acétonitrile/eau, dont le débit est réglé à 1,1 ml/min.

- La détection s'effectue par spectrofluorimétrie aux longueurs d'onde de 254 nm pour l'excitation et 412 nm pour l'émission.

- L'estimation quantitative des toxines dans les extraits est effectuée par étalonnage externe.

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Comparaison des extractions des PP2A

Les résultats obtenus avec les étalons et les échantillons pour le dosage de l'AO ont été identiques quel que soit l'origine des extraits enzymatiques PP2A (moule et lapin). Dans ces conditions, nous avons préféré travailler avec la méthode d'extraction la plus rentable. En effet, 10 g de moules permettent d'obtenir 60 ml d'extrait enzymatique, alors qu'il faut un lapin fraîchement tué pour obtenir 140 ml d'extrait. Les puretés des deux extraits sont différentes mais n'ont aucune conséquence sur les résultats du dosage du moment que la quantité d'enzyme dans le milieu réactionnel soit de 1 à 2 mM. L'extraction de la PP2A de moule est plus rapide car elle utilise de petits volumes qui peuvent être centrifugés et non plus filtrés.

II. Etalonnage

II.1. Vitesses enzymatiques de la gamme d'étalonnage

Les résultats ont été obtenus à partir de la PP2A de lapin et de moule. La figure 10 regroupe les courbes des cinétiques de formation du pNP. Les pentes de ces dernières correspondent aux vitesses enzymatiques (en DO/sec.) des solutions étalons. Les valeurs de DO_{405 nm} obtenues par le lecteur de plaque sont multipliées par 1000 afin de faciliter les calculs.

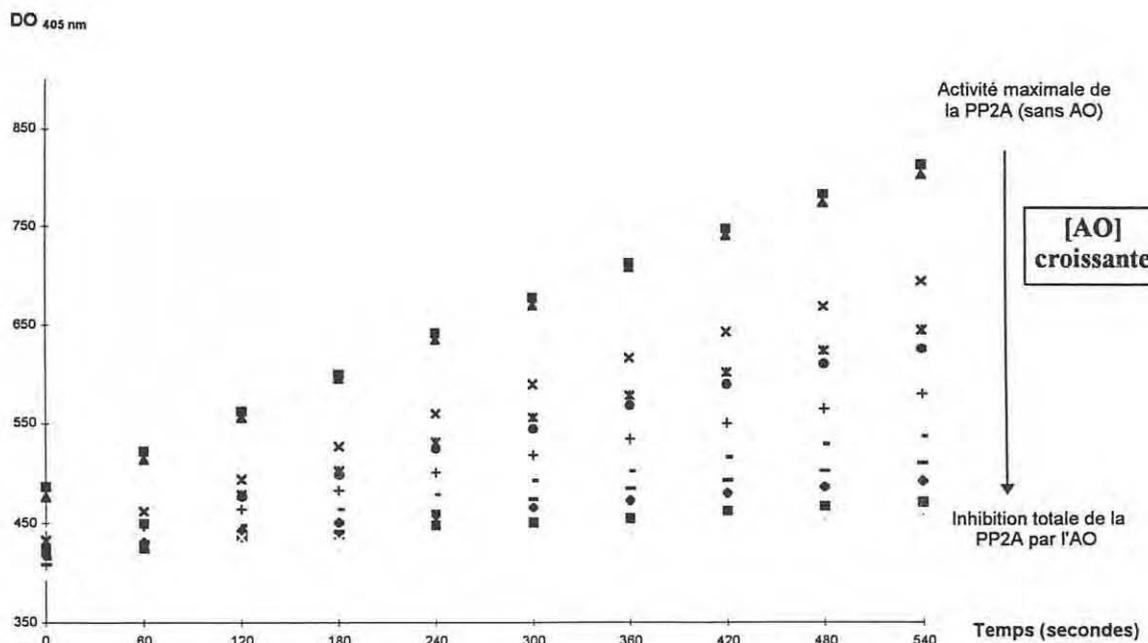


Figure 10 : Activité pNPP-phosphatase en présence et en absence d'AO

Pour chaque solution (étalon et échantillon), deux répliquats sont suffisants car un nombre supérieur s'est révélé inutile.

La détermination des pentes est basée sur la méthode des "moindres carrés" pour calculer une droite ajustée au plus près aux coordonnées, dont l'équation est $y = ax + b$, où la variable dépendante y (DO) est une fonction des variables indépendantes x (temps).

L'étude des paramètres cinétiques permet de montrer une bonne corrélation des variables et une reproductibilité des valeurs obtenues pour la gamme étalon et pour les échantillons d'hépatopancréas. Pour chaque cinétique, les grandeurs statistiques de régression sont :

- la pente : a ;
- l'intersection de la droite avec l'axe des ordonnées : b ;
- l'erreur-type pour le coefficient a : se_n ;
- l'erreur-type pour la constante b : se_b ;
- le coefficient de détermination (compare les valeurs y estimées et les valeurs y réelles) : r^2
- l'erreur-type pour l'estimation de y : se_y .

Le tableau 1 donne les activités relatives en fonction de la concentration d'AO. Pour une cinétique donnée :

V_i = Pente (i) - Pente du témoin négatif (100 ng/ml).

V_0 = Pente du témoin positif (0 ng/ml)

V_i/V_0 : Vitesse relative

PENTES	0 ng/ml	5 ng/ml	10 ng/ml	15 ng/ml	20 ng/ml	25 ng/ml	30 ng/ml	35 ng/ml	40 ng/ml	45 ng/ml	50 ng/ml	100ng/ml
1er répliquat	37.93	34.14	27.50	26.22	21.74	16.99	12.44	11.39	7.46	4.68	3.97	-1.49
2ème répliquat	36.79	36.74	29.41	24.64	22.61	17.32	13.61	11.29	7.94	5.34	6.93	-1.36
MOYENNE	37.36											-1.42

$V_i = P_i - P_{100}$	V_0	V_5	V_{10}	V_{15}	V_{20}	V_{25}	V_{30}	V_{35}	V_{40}	V_{45}	V_{50}	V_{100}
1er répliquat	39.42	35.63	28.99	27.71	23.23	18.48	13.93	12.88	8.95	6.17	5.46	0.00
2ème répliquat	38.15	38.10	30.76	26.00	23.97	18.68	14.96	12.65	9.30	6.70	8.29	0.00

V_i/V_0	1	0.904	0.735	0.703	0.589	0.469	0.353	0.327	0.227	0.156	0.139	0
	1	0.999	0.806	0.682	0.628	0.490	0.392	0.332	0.244	0.176	0.217	0

Tableau 1 : Détails de calculs des activités relatives en fonction de la [AO].

Le tableau 2 montre d'une part la vitesse (V_i/V_0) en fonction de [AO] et d'autre part les paramètres statistiques de la droite de régression linéaire

AO (ng)	0	0	0.05	0.05	0.1	0.1	0.15	0.15	0.2	0.2	0.25	0.25	0.3	0.3	0.35	0.35	0.4	0.4	0.45	0.45	0.5	0.5
V_i/V_0	1	1	0.904	0.999	0.735	0.806	0.703	0.682	0.589	0.628	0.469	0.490	0.353	0.392	0.327	0.332	0.227	0.244	0.156	0.176	0.139	0.217

pe	-1.97794	b	1.000	no	2	1/no	0.5
sen	0.06834	seb	0.016	N	18	N-2 ddl	16
r2	0.98126	sey	0.037	1/N	0.05556	t 0,975	1.746
		S	0.03743	moy. x	0.2	SCE	0.3

Tableau 2 : Paramètres statistiques de la gamme étalon.

Légende :

n_o : nombre de mesures pour chaque quantité d'AO

N : nombre total de mesures pour l'élaboration de la droite d'étalonnage

S : estimation de l'écart-type lié (erreur-type.XY)

SCE : Somme Carrée des Ecarts

S : estimation de l'écart-type lié (erreur-type.XY)
 SCE : Somme Carrée des Ecart
 ddl : degré de liberté

Les droites d'étalonnage obtenues avec les protéines phosphatases de lapin et de moule sont représentées dans la figure 11. Nous pouvons constater qu'elles sont pratiquement identiques.

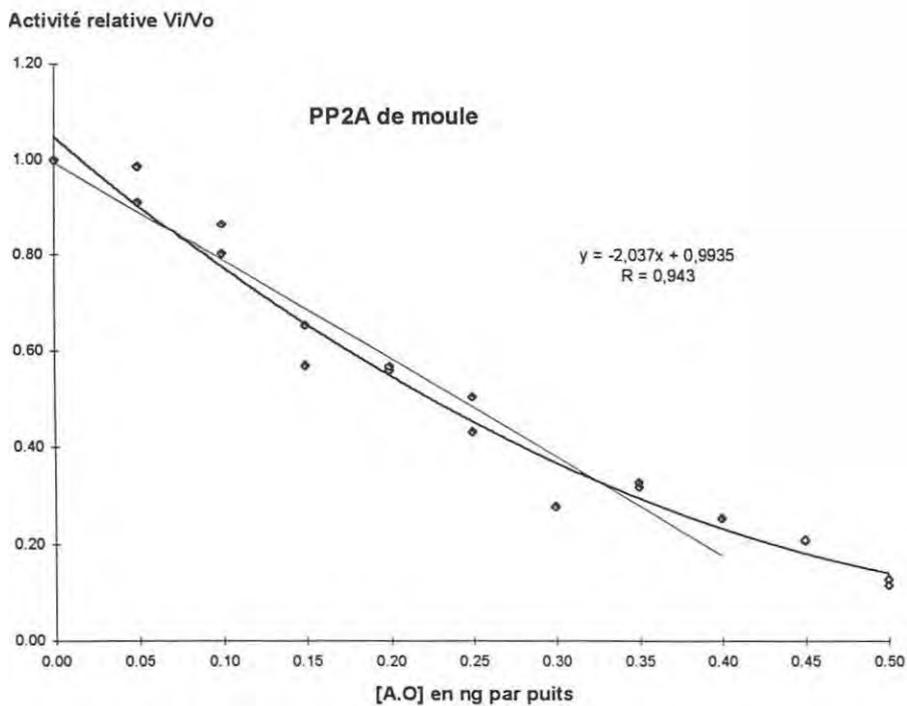
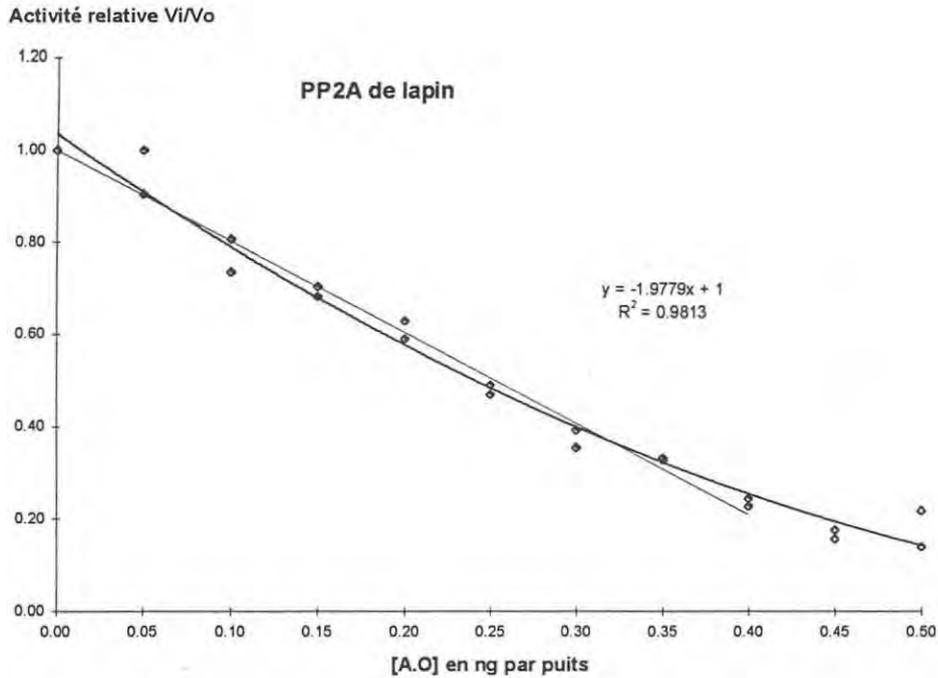


Figure 11 : Comparaison des gammes d'étalonnage de la PP de lapin et de moule

II.2. Variances de la droite d'étalonnage

Pour chaque gamme étalon, il a été réalisé des tests de stabilité des variances (COCHRAN, HARTLEY, BARTLETT, 1978). Dans un premier temps, les études statistiques ont été faites avec plusieurs répliquats par échantillons (ddl de 10 à 15) en utilisant le test de BARTLETT (ddl ≥ 5). Par la suite, seuls deux répliquats se sont révélés suffisants sans altérer les résultats statistiques. C'est pourquoi, nous avons utilisés les tests de COCHRAN et de HARTLEY où les populations de valeurs doivent être normales et les nombres de degrés de liberté associés à chaque estimation de variance doivent être égaux (2 répliquats soit 2 mesures).

En désignant par s^2_{\max} et s^2_{\min} la plus forte et la plus faible des estimations s^2_i , des variances des différentes populations, les fonctions discriminantes sont définies par les formules :

$$g = s^2_{\max} / \sum s^2_i \quad \text{pour le test de Cochran}$$

$$r = s^2_{\max} / s^2_{\min} \quad \text{pour le test de Hartley}$$

En théorie, une inégalité entre les variances ne peut entraîner qu'une augmentation de la fonction discriminante. Un risque α (0,5) ayant été choisi, le domaine de refus est situé entièrement à droite de la limite supérieure, $g_{1-\alpha}$ ou $r_{1-\alpha}$ du domaine d'acceptation. La décision est prise en comparant la valeur numérique g ou r , calculée à partir des résultats expérimentaux, à la limite $g_{1-\alpha}$ ou $r_{1-\alpha}$.

L'hypothèse H_0 de l'égalité des variances est refusée quand la valeur numérique est supérieure à la limite, elle est acceptée quand cette valeur est inférieure à la limite (tab. 3).

(AO) en ng/puits	0	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.35	0.4	0.45	0.5	1
Vi/Vo 1er répliq.	1	0.90377	0.73543	0.70284	0.58924	0.46872	0.35342	0.32683	0.227	0.156	0.139	0
Vi/Vo 2ème répli.	1	0.99873	0.80648	0.6816	0.62838	0.48967	0.39228	0.33159	0.244	0.176	0.217	0
Variance	0	5E-03	3E-03	2E-04	8E-04	2E-04	8E-04	1E-05	1E-04	2E-04	3E-03	0
Somme des var.	0.0124											
Var min.	1E-05											
Var max.	5E-03											

Tableau 3 : Détermination des variances liées de la droite étalon.

Test de Cochran g : valeur expérimentale = 0.3625

valeur théorique = 0.541

Test de Hartley r : valeur expérimentale = 398

valeur théorique = 704

Les valeurs théoriques sont déterminées à l'aide de tableaux statistiques. Nous avons fixé l'intervalle de confiance de la concentration en AO au niveau de probabilité de 95 %. Le nombre de variances de la gamme étalon est de 12. Le degré de liberté est égal à 1, (2 mesures). L'hypothèse de l'égalité des variances est acceptée car la valeur expérimentale est inférieure à la valeur limite théorique.

L'étude de la droite de régression de la gamme d'étalonnage permet de dire que la variance liée est constante, donc que la linéarité de la gamme étalon est bonne. Dans ce cas, l'intervalle de confiance des résultats des échantillons est constant en fonction de la concentration en AO des extraits.

II.3. Reproductibilité

La gamme étalon de la réaction enzymatique, établie à chaque dosage, s'avère constante dans le temps. L'activité de l'extrait protéique de la PP2A est stable. Le tableau 4 montre les résultats obtenus sur plusieurs gammes étalons. Nous obtenons une bonne corrélation et une très bonne reproductibilité.

	PENTE	ORDONNEE A L'ORIGINE	COEFFICIENT DE CORRELATION	ABSCISSE A L'ORIGINE
	-2.149	0.974	0.953	0.453
	-2.196	0.947	0.947	0.431
	-2.298	1.043	0.964	0.454
	-2.451	1.035	0.965	0.422
	-2.356	1.041	0.960	0.442
	-1.884	1.032	0.912	0.548
	-2.076	1.080	0.914	0.520
	-2.296	0.929	0.946	0.405
	-1.978	1.000	0.981	0.506
	-2.021	0.997	0.891	0.493
	-1.842	0.972	0.930	0.528
	-2.043	0.995	0.945	0.487
	-2.200	0.918	0.921	0.417
MOYENNE	-2.138	0.997	0.941	0.470
ECART-TYPE	0.184	0.048	0.026	0.047

Tableau 4 : Caractéristiques des gammes d'étalonnages.

III. Les échantillons

III.1. Analyses des échantillons

Pour un échantillon, nous mesurons les cinétiques sur 540 secondes (10 mesures) pour plusieurs quantités d'hépatopancréas (HP) déterminées lors des dilutions : 250 ; 187,5 ; 125 ; 62,5 ; 31,25 et 15,62 µg par puits. On remarque que les courbes obtenues (fig. 12) de l'échantillon de baie de Seine (DS1), sont identiques à celles obtenues pour les étalons. Les détails des calculs sont dans le tableau 5.

	DS 1						DS2					
PENTES	250	187,5	125	62,5	31,25	15,62	250	187,5	125	62,5	31,25	15,62
	17.92	22.12	28.18	34.40	33.05	35.98	1.65	2.19	2.90	4.52	11.56	24.80
	15.56	18.84	25.32	29.42	31.22	33.48	1.45	1.39	2.76	4.09	11.44	23.39
MOYENNE	16.74	20.48	26.75	31.91	32.14	34.73	1.55	1.79	2.83	4.31	11.50	24.09
Vi = Pi-P100	250	187,5	125	62,5	31,25	15,62	250	187,5	125	62,5	31,25	15,62
	18.17	21.90	28.18	33.34	33.56	36.15	2.98	3.22	4.26	5.73	12.92	25.52
Vi/Vo Y	250	187,5	125	62,5	31,25	15,62	250	187,5	125	62,5	31,25	15,62
Vi/Vo Y	0.49	0.59	0.75	0.89	0.90	0.97	0.08	0.09	0.11	0.15	0.35	0.68

Tableau 5 : Détails de calculs des activités relatives des échantillons DS1 et DS 2.

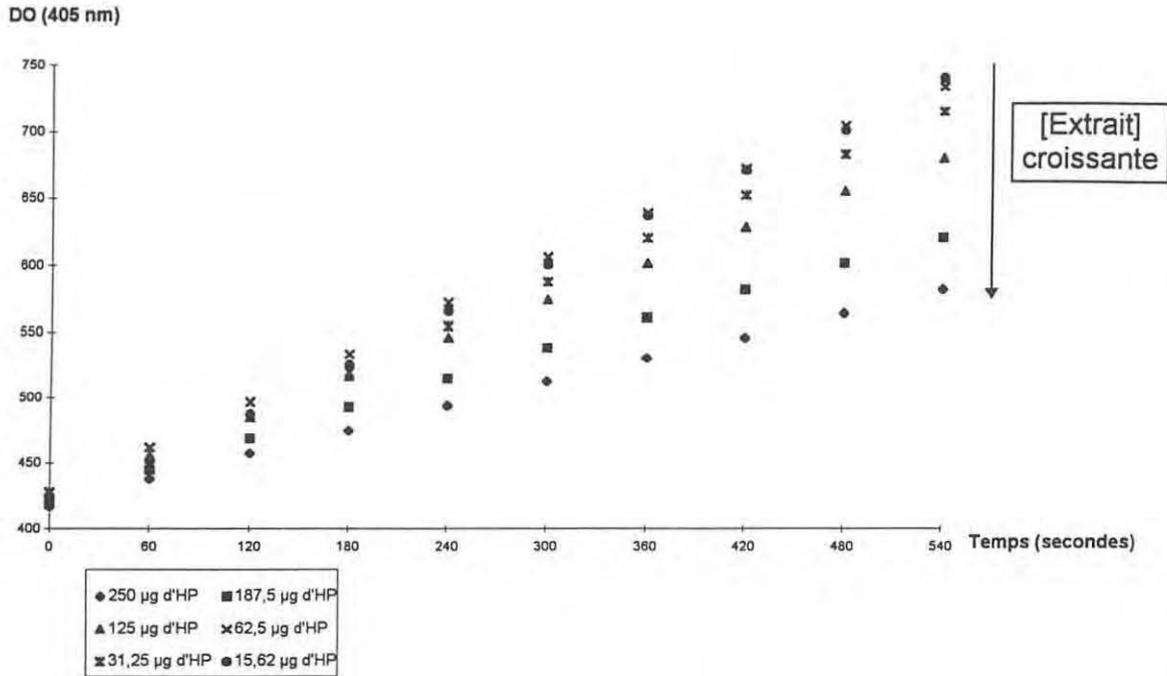


Figure 12 : Cinétiques d'activité pNPP-phosphatasique selon les dilutions de DS1

Pour la suite du traitement des données, il faut partir des dilutions qui donnent des V_i/V_0 comprises entre 0,30 et 0,85. Soit 250 et 187,5 µg d'hépatopancréas pour l'échantillon DS 1 ; 31,25 et 15,62 µg d'hépatopancréas pour l'échantillon DS 2.

Par la suite, nous déterminons la valeur de la variable de Student et de l'erreur-type.XY (SO) pour connaître l'intervalle de confiance de la concentration en toxine.

III.2. Intervalle de confiance du résultat d'analyse

A partir de la droite d'étalonnage où x représente la grandeur objet final et y représente le facteur analytique, la concentration de l'AO dosé est déterminée en reportant la moyenne y_0 de 2 mesures de V_i/V_0 (2 répliquats sur la plaque) sur la droite d'étalonnage pour en déduire une valeur x_0 ([AO] en ng). L'intervalle de confiance recherché est l'intervalle (x_1, x_2) autour de x_0 qui contient la vraie valeur m_0 avec une probabilité $(1-\alpha)$:

$$\text{Prob}(x_1 < m_0 < x_2) = 1 - \alpha$$

Les étalons et les échantillons sont des produits analogues traités de façon identique (tab. 6). Dans ce cas, la dispersion des mesures est la même pour les échantillons et les étalons, et l'intervalle de confiance peut être obtenu à partir de l'hyperbole d'équation :

$$y = a x_0 + b \pm s_0 \times t_{1-\alpha/2}$$

$$s_o = s \sqrt{\frac{1}{n_o} + \frac{1}{N} + \frac{(x_o - X)^2}{\sum (x_i - X)^2}}$$

- s est l'estimation de l'écart-type lié déterminé à partir des étalons (erreur-type.XY sous Excel 5).
- N est le nombre total de mesures ayant servi au calcul de la droite d'étalonnage.
- X et $\sum (x_i - X)^2$ sont les valeurs obtenues et employées au cours du calcul de la droite d'étalonnage.
- $t_{1-\alpha/2}$ est la valeur de la variable de Student (N-2) degrés de liberté telle que $\text{Prob}(|t| < t_{1-\alpha/2}) = 1 - \alpha$.

La formule montre que l'écart-type estimé par s_o correspond à la combinaison de deux erreurs :

- erreur liée à la mesure de y_o ; variance estimée par s^2/n_o
- erreur liée à l'emploi d'une courbe d'étalonnage imprécise.

		DS 1		DS 2	
		250 µg	187,5 µg	31,25 µg	15,62 µg
S _o		0.028	0.028	0.013	0.009
S _o * t _{1-α/2}		0.049	0.049	0.022	0.016
Quantité d'AO en ng par puits	x ₀ -(S _o * t _{1-α/2})	0.235	0.185	0.320	0.152
	x ₀	0.260	0.209	0.331	0.160
	x ₀ +(S _o * t _{1-α/2})	0.285	0.234	0.342	0.168
Quantité d'AO en µg/g d'hépatopancréas	val. min.	0.939	0.985	10.229	9.735
	val. moy.	1.039	1.116	10.583	10.257
	val. max.	1.139	1.247	10.938	10.778

Tableau 6 : Résultats du dosage de l'AO.

L'intervalle de confiance est identique entre les échantillons peu concentrés (DS1) et pour les échantillons plus concentrés (DS2). Il varie de 5 à 10 %. Compte tenue des petites quantités dosées (µg), et du fait qu'il s'agisse d'un test biologique, nous pouvons considérer que cet intervalle de confiance est faible.

III.3. Reproductibilité

Les échantillons de glandes digestives de moules ont été analysés au moins quatre fois à des jours différents (tab. 7). Les concentrations d'AO résultent des valeurs moyennées. Quelle que soit l'origine des échantillons et leur concentration en toxines, la variabilité est relativement faible et constante (écart-type moyen : $0,27 \pm 0,04$ μg d'AO par g d'hépatopancréas). L'ensemble des résultats montre donc une très bonne reproductibilité.

Origines	Echantillons	[AO] en $\mu\text{g}/\text{g}$ d'HP	Ecart-type
Etang de SALSES	11.12.95	3.67	0.22
Etang de SALSES	26.12.95	8.51	0.30
Etang de SALSES	08.01.96	5.79	0.29
Etang de SALSES	15.01.96	3.22	0.31
Etang de SALSES	30.01.96	3.20	0.25
Etang de SALSES	12.02.96	2.76	0.30
Etang de LEUCATE	26.12.95	2.50	0.29
Etang de LEUCATE	11.12.95	2.55	0.25
Etang de LEUCATE	24.01.96	3.89	0.27
Etang de LEUCATE	29.01.96	2.70	0.30
NORMANDIE	26.03.96	1.73	0.17
BAIE DE SEINE	jul-94	1.13	0.31
OCTEVILLE FOND	jul-94	10.54	0.26
OCTEVILLE MILIEU	jul-94	5.16	0.26
OCTEVILLE SURFACE	jul-94	9.97	0.22
SEMOY -2m	jul-94	10.60	0.35

tableau 7 : Reproductibilité des dosages de l'AO des échantillons de glandes digestives.

III.4. Corrélation avec la C.L.H.P.

Le dosage de l'acide okadaïque par C.L.H.P. sert de test de référence pour la détection des DSP. Le test biochimique dose toutes les molécules ayant une action sur les protéines phosphatases, tandis que la C.L.H.P. ne dose que l'acide okadaïque et la DTX1. Il est donc intéressant de comparer les deux méthodes d'autant plus que les principes sont différents.

De manière générale, les résultats obtenus par le test des phosphatases sont supérieurs à ceux obtenus par C.L.H.P. (fig. 13). Dans le cas d'un témoin négatif (sans AO dosé en C.L.H.P.), le dosage par les phosphatases donne une réponse positive ($0,2$ $\mu\text{g}/\text{g}$ d'HP). YASUMOTO (1995) a fait la même observation. Cette différence peut être due, soit à la sensibilité du test biochimique, soit à la présence dans les moules de molécules agissant sur l'activité des phosphatases, soit à un éventuel effet matrice des moules.

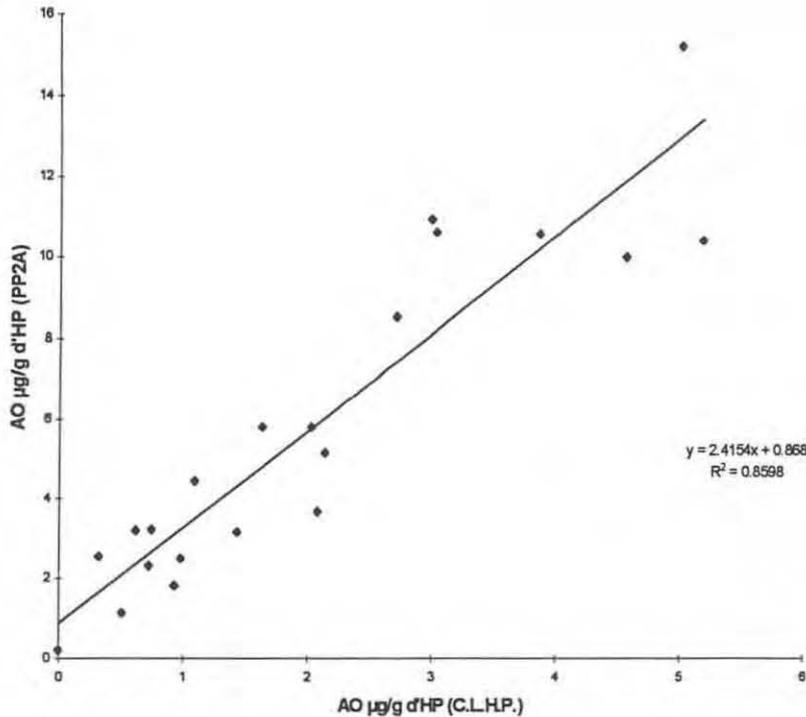


Figure 13 : Corrélation des dosages C.L.H.P. et PP2A

Les résultats montrent que l'écart de dosage entre les deux tests n'est pas constant. Il ne s'agit donc pas d'un problème de sensibilité du test biochimique. La corrélation entre les deux tests est de 0,86. Cette valeur est acceptable sachant qu'il s'agit d'un test biochimique dosant l'acide okadaïque et d'autres substances inhibant les protéines phosphatases (produits de dégradation de l'AO, autres substances actives présentes dans les moules).

L'expérience de dosage d'extraits secs d'hépatopancréas de moules saines, donne des quantités de toxine dosées supérieures aux quantités d'AO dopées. Dans ce cas, nous pouvons supposer que le test dose l'AO dopé et des substances présentes dans le milieu agissant sur les phosphatases. Cela rejoint l'idée émise précédemment. La figure 14 montre la corrélation entre la quantité dopée et la quantité dosée. Le coefficient de corrélation est élevé ($r^2 = 0.97$) ce qui laisserait supposer qu'il n'y a pas d'effet matrice sur le dosage.

AO dosé en µg/g d'HP
(PP2A)

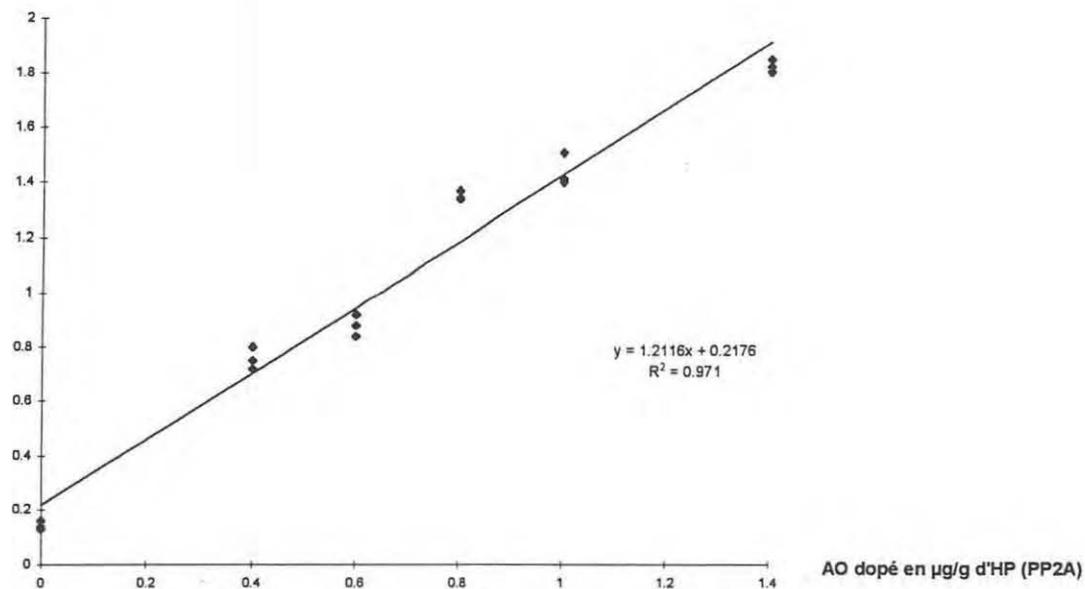


Figure 14 : Corrélation entre AO dopé et AO dosé

Conclusion

En France, afin de protéger les consommateurs des intoxications diarrhéiques provoquées par les coquillages contaminés par *Dinophysis sp*, le réseau de surveillance des algues toxiques (REPHY) effectue des contrôles de salubrité des coquillages. Il contrôle la toxicité de ces derniers à l'aide d'un test de létalité sur souris. Ce test, peu sensible, non spécifique et utilisant des animaux vivants, doit être remplacé par une méthode alternative de détection rapide et fiable. C'est dans ce cadre que s'est effectué mon stage, le but étant d'étudier la faisabilité du dosage de l'acide okadaïque par inhibition des protéines phosphatases. En effet, l'AO, toxine majoritairement responsable des Intoxications Diarrhéiques par les Fruits de Mer (I.D.F.M.) en France, est un inhibiteur spécifique de l'activité paranitrophénylphosphate-phosphatasique de la protéine phosphatase 2A.

Dans un premier temps, il a fallu mettre au point une méthode d'extraction de la protéine phosphatase qui soit simple et rapide. Sur les deux sources d'extrait enzymatique étudiées (lapin, moules), nous avons retenu celle des moules. Elle se caractérise par sa simplicité, sa rapidité, son faible coût, de plus elle n'utilise pas d'animaux vivants.

L'ensemble des résultats obtenus permet d'aboutir aux conclusions suivantes :

- Les résultats de la gamme d'étalonnage de l'AO ont permis d'établir qu'il existait une bonne corrélation, entre la quantité d'AO et l'activité relative de l'enzyme, ainsi qu'une très bonne reproductibilité ($r = 0,94 \pm 0,026$). De même, nous avons constaté une très bonne reproductibilité des résultats pour les échantillons avec un écart-type moyen de $0,27 \pm 0,04$ µg d'AO par g d'hépatopancréas.

- La méthode possède une bonne sensibilité avec une limite de détection de 0,05 ng d'AO, alors qu'elle est de 1 ng pour la Chromatographie Liquide Haute Performance (C.L.H.P.).

- Il existe une bonne corrélation entre la méthode biochimique et la C.L.H.P. ($r = 0,86$), bien que, le dosage biochimique dose toutes les molécules inhibant les protéines phosphatases alors que la C.L.H.P. dose l'acide okadaïque et la DTX-1 (dérivé de l'AO).

Cette méthode de dosage de l'AO par les PP2A est prometteuse, car elle est rapide (extraction des hépatopancréas et dosage en une journée), simple par l'utilisation des microplaques et d'une feuille de calcul informatique.

Néanmoins, pour utiliser ce test en routine, ce travail nécessite une étude pilote sur le terrain entre les laboratoires côtiers de l'IFREMER et une intercalibration des résultats.

De plus, il serait intéressant d'identifier la nature précise des substances inhibant les protéines phosphatases présentes dans les moules, autre que l'acide okadaïque.

Bibliographie

- 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**, 1419-1425.
- AMZIL Z. (1993). **L'acide okadaïque. Optimisation de la purification. Nouvelle méthode de détection biologique.** Thèse de Doctorat de l'Université de Nantes.
- AUNE T. (1989). **Toxicity of marine and freshwater algal biotoxins towards freshly prepared hepatocytes.** In : *Mycotoxins and Phycotoxins '88. 7th Int. IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins*, 16-19 August 1988, Tokyo. NATORI S. HASHIMOTO K. et UENO K. Edit. ELSEVIER, Amsterdam, 1989,461-468.
- BIALOJAN C., TAKAI A. (1988). **Inhibitory effect of a marine sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics.** *Biochem. J.*, **256**, 283-290.
- COCHRAN, HARTLEY, BARTLEY. (1978). **Comparaison de trois variance ou plus. Statistiques appliquées à l'exploitation des mesures, tome II, Commissariat à l'énergie atomique,** Masson, 219-222.
- COHEN P., ALEMANY S., HEMMINGS B.A., RESINK J.J., STRALFORS P., THUNG H.L.V. (1988). **Protein-phosphatases 1 and protein phosphatase 2A from rabbit skeletal muscle.** *Methods in Enzymology*, **159**, 390-408.
- DALZELL P. (1994). **Management of ciguatera fish poisoning in the South Pacific.** *Memoirs of the Queensland Museum*, **34** (3), 471-479.
- EDEBO L., LANGES S., LI X.P., ALLENMARK S. (1988). **Hepatopancreas tissue homogenate from DSP-mussels and okadaic acid induce rapid hypersecretion and anti-secretory peptides in the rat small intestine.** *7th. Int. IUPAC Symp. on Mycotoxins and Phycotoxins*, Tokyo.
- FUJIKI H., SUGANUMA M., SUGURI H., YOSHIZAWA S., OJIKA M., WAKAMATSU K., YAMADA K., SUGIMURA T. (1987). **Induction of ornithine decarboxylase activity in mouse skin by a possible tumor promoter, okadaic acid.** *Proc. Jap. Acad. Ser. B*, **63**, 51-53.
- HALLENGRAEFF G.M. (1993). **A review of harmful algal blooms and their apparent global increase.** *Phycologia*, **32** (2), 79-99.

- HENDERSON P.J.F. (1972). A linear equation that describes the steady-state kinetics of enzymes and subcellular particles interacting with tightly bound inhibitors. *Biochem. J.*, **127**, 321-333.
- HUNGERFORD J.M., WEKELL M.M. (1992). Analytical methods for marine toxins. In : *Food Poisoning, Handbook of Natural Toxins* : (Tu A.T., Ed.), Marcel Dekker, Inc., New-York, 415-473.
- KUMAIGAI M., YANAGI T., MURATA M., YASUMOTO T., KAT M., LASSUS P., RODRIGUEZ-VAZQUEZ J.A. (1986). Okadaic acid as the causative toxin of diarrhetic shellfish poisoning in Europe. *Agric. Biol. Chem.*, **50** (11), 2853-2857.
- LEE J.S., YANAGI T., KENMA R., YASUMOTO T. (1987). Fluorimetric determination of diarrhetic shellfish toxins by high-performance liquid chromatography. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 877-881.
- LEVINE L., FUJIKI H., YAMADA K., OJIKI M., GJIKA H.B., VUNAKIS H.V. (1988). Production of antibodies and development of a radio-immunoassay 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* : WHITE, BADEN Ed. Elsevier, New-York, 485-488.
- MURAKAMI Y., OSHIMA Y., YASUMOTO T. (1982). Identification of okadaic acid as a toxic component of a marine dinoflagellate Prorocentrum lima. *Bulltin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, **48** (1), 69-72.
- OZAKI H., KOHAMA K., NONOMURA Y., SHIBATA S., KARAKI W. (1987a). Direct activation by okadaic acid of the contractile elements in the smooth muscle of guinea pig taenia coli. *Namryn-Schiedeberts Arch. Pharmacol.*, **335**, 356-358.
- OZAKI H., ISHIHARA H., KOHAMA K., NONOMURA Y., SHIBATA S., KARAKI W. (1987b). Calcium independant phosphorylation of smooth muscles myosin light chain by okadaic acid isole. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **243**, 1167-1173.
- PELMONT J. (1993). *Enzymes. Collection Grenoble Sciences* 2 Ed., 318-328.
- SHIBATA S., ISHIDA Y., KITANO H., OHIZUMI Y., HABON J., TSUKITANI Y., KIKUCHI H. (1982). Contractile effects of okadaic acid, a novel ionophore-like substance from black sponge, on isolated smooth muscles under the condition of Ca deficiency. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **223**, 135-143.

- 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 B., BERLAND B., ERAD-LE DENN E., GENTHEN P., GRZEBYK D., MARCAILLOU-LE BAUT C., LASSUS., PARENISKY F. (1991). **Le phytoplancton nuisible des côtes de France.** Ed. IFREMER, Brest.
- SOURNIA A. (1995). **Red tide and toxic marine phytoplankton of the world ocean : an inquiry into biodiversity.** In : "*Harmful Marine Algal Blooms*", (Lassus P., Arzul G., Erard E., Genthen P., Marcaillou C., Eds.). *Lavoisier LTD*, 103-112.
- STABELL O.B., STEFFENAK I., PEDERSEN K., UNDERDAL B. (1991). **Diversity of shellfish toxins of "diarrhetic" type revealed by biological and chemical assays.** *J. Toxicol. Environ. Health*, 33, 273-282.
- TACHIBANA V., SCHEUNER P.J., TSUKITANI Y., KIKUCHI H., VANENDEN D., CLARDY J., GOPICHAND Y., SCHMITZ F.J. (1981). **Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two sponges of the genus Halichondria.** *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 2469-2471.
- TAKAI A., MIESKES G. (1991). **Inhibitory effect of okadaic acid on the p-nitrophenyl phosphate phosphatase activity of protein phosphatases.** *Biochem. J.*, 275, 233-239.
- TUBARO A., SOSA S., DELLA-LOGGIA R. (1992). **Diarrhetic shellfish toxins in Adriatic Sea mussels evaluated by ELISA method.** *Toxicon.*, 30, 673-676.
- UDA T., ITOH Y., NISHIMURA M., USAGAWA T., MURAT M., YASUMOTO T. (1989). **Enzyme immunoassay using monoclonal antibody specific for diarrhetic shellfish poisons.** *IUPAC August 1988, 7 The Int. symp. on Mycotoxins and Phycotoxins.* Ed. *Els. Sci. Pub. B.V.*, Amstredam, 335-342.
- USAGAWA T., NISHIMURA M., ITOH U., UDA T., YASUMOTO T. (1989). **Preparation of monoclonal antibodies against okadaic acid prepared from the sponge Halichondria okadai.** *Toxicon.*, 27, 1323-1330.
- 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 fortii as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning.** *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 46 (11), 1405-1411.

YASUMOTO T., MURATA M., OSHIMA Y., MATSUMOTO G.K., CLARDY J. (1984). **Diarrhetic shellfish poisoning.** In : *Seafood Toxins*. ACS Symposium series, **262**, (RAGELIS E.P. Ed.) American chemical Society, 207-214.

YASUMOTO T., MURATA M., OSHIMA Y., SANO M., MATSUMOTO G.K., CLARDY J. (1985). **Diarrhetic shellfish toxins.** *Tetrahedron*, **41**, 1019-1025.

YASUMOTO T., TAKAHASHI H., TANAKA M., OSHIMA Y; TAKAI A. (1995). **Application of anti-proteinphosphatase 2A activity for the measurement of DSP toxicity in shellfish.** In : "*Seventh International Conference on Toxic Phytoplankton*", Sendai, Japon, (sous presse).

Annexe

Annexe A - Détermination des fractions à activité phosphatasique.

Annexe B - Préparation du tampon d'extraction des PP2A de moule.

Annexe C - Purification de la PP2A de moule.

Annexe D - Préparation de la gamme étalon.

Annexe E - Préparation des milieux d'essai.

Annexe F - Incorporation des échantillons.

Annexe G - Résultats des étalons et des échantillons.

Matériel utilisé

Annexe A - Détermination des fractions à activité phosphatasique

Récupération des fractions à la sortie de la colonne de chromatographie
Pour chaque fraction de 2,6 ml :

Utilisation d'une microplaque (une fraction par puit) :

Incorporer 90 μ l de mélange BSA-DTT 50/50

Ajouter 10 μ l de fraction enzymatique

Ajouter le substrat pNPP dans le puit (la réaction enzymatique commence)

Faire une lecture de $DO_{405\text{ nm}}$ à 0 mn. et à 5 mn.

Calculer la différence de DO en 5 mn.

Composition du milieu d'essai :

- Tri/ HCL	40 mM pH 8,5
- KCL	20 mM
- MgCL ₂	30 mM
- Dithiotreithiol	16 mM (agent réducteur)
- BSA	4 mg/ml
- pNPP	40 mM (en excès)

Annexe B - Préparation du tampon d'extraction des PP2A de moule

MOPS

(3-[N- Morpholino]propane sulfonic acid)

pKa = 7,2 à 25 °C

C₇H₁₅NO₄S FW 209,3

Tampon d'extraction MOPS :

MOPS 10 mM

DTT 1 mM

MgCl₂ 2 mM

Benzamidine 1 mM

TPCK 1 mM

1/1000 du vol. en PMSF à 2,5 % dans du MeOH

Ajuster le pH à 7,5 (4 °C) avec de la soude.

Annexe C - Purification de la PP2A de moule

Après plusieurs précipitations des protéines, l'extrait brut protéique subit un passage sur une colonne DEAE Sépharose CL6B (Pharmacia 20% Ethanol as preservative), de diamètre 1,5 cm, de hauteur 14 cm, de volume 24,74 ml.

La séparation de l'extrait en deux fractions nous a permis d'essayer deux protocoles d'éluion sur la colonne DEAE Sépharose.

Première chromatographie :

Vitesse d'éluion de 20 ml/heure

Equilibrage de la colonne avec 20 ml de tampon d'extraction

Passage de 20 ml d'extrait brut

Lavage avec 20 ml de tampon d'extraction + 80 mM de NaCl

Eluion par 60 ml de gradient de 80 à 400 mM NaCl dans du tampon d'extraction

Lavage par 20 ml de tampon d'extraction + 400 mM NaCl

Le gradient est récupéré en fraction de 2,6 ml (50 gouttes).

Les fractions sont analysées par le test au pNPP pour déterminer celles qui possèdent une activité phosphatasique. Ces dernières sont testées en présence d'AO pour voir lesquelles sont inhibées, donc contenant la PP2A.

Deuxième chromatographie :

Vitesse d'éluion de 30 ml/heure

Equilibrage de la colonne avec 20 ml de tampon d'extraction

Passage de 20 ml d'extrait brut

Lavage avec 20 ml de tampon d'extraction + 80 mM de NaCl

Eluion par 60 ml de gradient de 80 à 500 mM NaCl dans du tampon d'extraction

Lavage par 20 ml de tampon d'extraction + 500 mM NaCl

Le gradient est récupéré en fraction de 2,6 ml (50 gouttes).

Les fractions sont analysées par le test au pNPP pour déterminer celles qui possèdent une activité phosphatasique. Ces dernières sont testées en présence d'AO pour voir lesquelles sont inhibées, donc contenant la PP2A.

Avec ce deuxième protocole de chromatographie les PP "sortent" plus rapidement de la colonne.

Annexe D - Préparation de la gamme étalon

A partir d'un vial contenant 1 μ g d'acide okadaïque, préparer une solution mère de 1ng/ μ l (soit ajouter 1000 μ l de méthanol (CH₃OH) à 1 μ g d'AO).

volume d'AO en ml	5 5 ng	10 10 ng	15 10 ng	20 10 ng	25 10 ng	30 10 ng	35 10 ng	40 10 ng	45 10 ng	50 10 ng	100 10 ng
Volume de milieu de base en ml	995	990	985	980	975	970	965	960	955	950	900

Les 1000 μ l de chaque concentration d'AO sont répartis dans des puits d'une plaque de micro-titration afin de les prélever plus facilement à l'aide d'une micro-pipette multi-canaux lors des expériences. Ce genre de conditionnement permet de mettre la gamme standard à -30°C et d'utiliser rapidement celle-ci. La conservation peut durer six mois, selon les résultats de SIMON.

Annexe E - Préparation des milieux d'essai

→ Milieu de base

Tris	40mM	peser : 0.4846 g
KCL	20mM	peser : 0.1492 g
MgCL ₂	30mM	peser : 0.6102 g
H ₂ O	q.s.p.	compléter à : 100 ml

Ajuster le pH à 8,5 avec HCL 0,1 N.

→ Milieu BSA (Sérum albumine bovine)

B.S.A.	4 mg/ml	peser : 0.0400 g
Milieu de base	q.s.p.	compléter à : 10 ml

→ Milieu DTT (C₄H₁₀O₂S₂)

D.T.T.	16mM	peser : 0.0246 g
Milieu de base	q.s.p.	compléter à : 10 ml

→ Milieu pNPP (C₆H₄NNa₂O₆P, 6H₂O)

pNPP	40 mM	peser : 0.1578 g
Milieu de base	q.s.p.	compléter à : 15 ml

Les milieux BSA, DTT et pNPP sont préparés extemporanément. Le milieu de base peut se conservé jusqu'à trois jours.

Annexe F - Incorporation des échantillons

Toutes les solutions (étalon et échantillon) sont analysées deux fois sur la plaque, l'utilisation de répliquat permet de renforcer les résultats obtenus.

La gamme d'étalonnage de l'AO va de 0 à 100 ng (0 ; 5 ; 10 ; 15 ; 20 ; 25 ; 30 ; 35 ; 40 ; 45 ; 50 ; 100 ng d'AO par puits). Soit 12 puits (1 ligne) répliqués une fois (2 lignes). Sur une plaque, six échantillons sont analysés.

Pour un échantillon :

six quantités d'hépatopancréas

deux répliquats par quantité d'hépatopancréas

⇒ douze puits par échantillon.

Un schéma de plaque est détaillé dans la figure F. Les chiffres représentés correspondent à des volumes en μl des solutions contenues dans les puits.

BSA-DTT : 80 μl
Extrait d'AO (standard ou de moule) : 10 μl
Extrait enzymatique : 10 μl
Substrat (pNPP) : 100 μl

Volume réactionnel du puits : 200 μl

L'abréviation E correspond aux échantillons : E1, E2, E3, E4, E5, E6.

Programmation du lecteur de plaque :

La programmation du lecteur de plaque se fait par ordinateur à l'aide d'une interface et d'un programme de transfert réalisé à l'IFREMER. La lecture se fait à 30 °C à 405 nm, toutes les minutes pendant 10 minutes. La plaque est agitée délicatement 5 secondes avant chaque lecture .

Annexes

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	90	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	90
	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	0
	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
B	90	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	90
	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	0
	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
C	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80
	10 E1	10 E2										
	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
D	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80
	10 E1	10 E2										
	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
E	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80
	10 E3	10 E4										
	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
F	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80
	10 E3	10 E4										
	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
G	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80
	10 E5	10 E6										
	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
H	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80
	10 E5	10 E6										
	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Figure F : Schéma d'utilisation d'une plaque pour l'analyse des échantillons

Annexes

Annexe G - Résultats des étalons et des échantillons

Le tableau G-1 présente les DO ($\times 1000$) des solutions de différentes concentrations en AO. Les DO sont mesurées toutes les 60 secondes (mesures n° 0 à n° 9). Pour chaque solution, il y a deux répliquats.

PP2A ul	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	0
[A.O] en ng/ml	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	100
0	488	459	464	438	430	416	415	423	424	420	410	461
1	525	494	491	463	455	437	426	434	431	427	414	454
2	567	530	529	499	479	456	442	450	442	432	420	452
3	609	568	552	526	504	475	457	462	448	435	423	449
4	649	605	586	552	526	494	471	474	455	441	427	447
5	684	640	614	579	545	510	484	486	464	445	431	446
6	723	673	640	602	566	525	495	497	470	449	435	444
7	759	703	662	627	588	541	505	507	478	455	439	446
8	791	733	685	651	607	555	516	514	483	459	442	446
9	828	764	711	673	627	570	524	525	492	463	446	445
0	487	477	433	425	425	424	415	409	418	423	398	445
1	522	514	462	450	450	443	432	422	431	428	405	440
2	563	556	494	479	477	464	448	437	443	437	412	436
3	600	596	527	503	499	483	464	451	451	439	422	434
4	642	635	560	531	525	501	479	462	458	448	427	433
5	678	670	590	556	545	518	493	474	466	451	434	432
6	713	709	617	579	569	534	502	485	473	455	442	431
7	748	741	643	602	590	550	516	493	480	462	449	431
8	783	774	669	624	611	565	529	502	486	467	454	431
9	814	804	695	645	626	580	537	510	492	471	459	431

Tableau G-1 : DO_{405 nm} en fonction des quantités d'AO.

pen	b
se _n	se _b
r ²	se _y

Pour chaque solution, on mesure les paramètres cinétiques :

[A.O] ul	0
37.9333	491.60
0.47	2.51
0.9988	4.27

[A.O] ul	5
34.14	463.27
0.52	2.78
0.9981	4.73

[A.O] ul	10
27.50	469.64
0.63	3.38
0.9958	5.74

[A.O] ul	15
26.22	443.02
0.52	2.77
0.9969	4.72

[A.O] ul	20
21.74	434.87
0.34	1.84
0.9980	3.13

[A.O] ul	0
36.79	489.45
0.44	2.34
0.9989	3.98

[A.O] ul	5
36.74	482.27
0.60	3.23
0.9978	5.49

[A.O] ul	10
29.41	436.67
0.51	2.73
0.9976	4.65

[A.O] ul	15
24.64	428.51
0.38	2.04
0.9981	3.47

[A.O] ul	20
22.61	429.95
0.45	2.38
0.9969	4.05

[A.O] ul	25
16.99	421.45
0.39	2.08
0.9958	3.54

[A.O] ul	30
12.44	417.51
0.39	2.06
0.9924	3.51

[A.O] ul	35
11.39	425.93
0.33	1.75
0.9934	2.99

[A.O] ul	40
7.46	425.13
0.15	0.78
0.9969	1.33

[A.O] ul	45
4.68	421.55
0.10	0.53
0.9965	0.89

[A.O] ul	25
17.32	428.25
0.35	1.85
0.9968	3.15

[A.O] ul	30
13.61	420.27
0.42	2.22
0.9926	3.77

[A.O] ul	35
11.29	413.69
0.41	2.21
0.9894	3.7586

[A.O] ul	40
7.94	424.07
0.36	1.90
0.9842	3.23

[A.O] ul	45
5.34	424.07
0.17	0.90
0.9920	1.54

[A.O] ul	50
3.97	410.84
0.08	0.42
0.9969	0.71

[A.O] ul	50
6.93	399.00
0.16	0.88
0.9955	1.49

[A.O] ul	100
-1.49	455.71
0.32	1.70
0.7335	2.89

[A.O] ul	100
-1.36	440.51
0.27	1.44
0.7587	2.46

Annexes

Nous effectuons les mêmes mesures et les mêmes calculs pour les échantillons analysés à des dilutions différentes. Le tableau G-2 (ci-dessous) présente les DO_{405 nm} en fonction des quantité d'hépatopancréas avec deux échantillons DS1 (Baie de Seine) et DS 2 (Octeville, prélèvement à - 10 mètres), récoltés en juillet 1994.

TEMPS (min.)	DS 1						DS 2					
	250	187,5	125	62,5	31,25	15,62	250	187,5	125	62,5	31,25	15,62
0	419	423	428	428	420	417	377	399	396	397	405	409
1	438	445	456	462	450	452	377	404	398	403	417	429
2	458	469	486	497	485	488	380	405	401	407	432	454
3	475	493	517	533	520	525	381	408	404	412	444	480
4	494	515	546	571	554	565	383	410	406	417	457	506
5	513	538	573	606	587	600	385	412	409	421	468	532
6	530	560	601	639	620	637	386	414	412	425	479	556
7	546	581	628	672	652	671	389	416	417	429	490	581
8	563	601	655	704	683	701	389	418	419	435	499	605
9	581	620	680	734	715	740	391	420	421	438	508	628
0	410	406	415	414	414	425	376	379	400	392	401	416
1	426	425	441	443	442	448	376	379	401	395	412	436
2	444	446	468	473	475	489	376	380	405	401	426	462
3	461	466	494	504	509	522	376	381	404	404	437	485
4	478	485	520	535	544	560	378	383	408	408	450	511
5	493	504	547	563	575	594	381	385	412	413	462	535
6	507	521	571	595	603	630	383	387	415	417	472	556
7	521	540	596	622	633	656	385	388	419	420	483	580
8	536	557	619	649	663	690	385	389	420	424	493	603
9	550	576	641	677	692	718	388	390	424	429	503	623

DS 1	250 µg d'HP	250 µg d'HP	187,5 µg d'HP	187,5 µg d'HP
	17.92 421.05	15.56 412.56	22.12 424.98	18.84 407.84
	0.17 0.92	0.25 1.33	0.26 1.37	0.18 0.95
	0.999 1.565	0.998 2.26	0.999 2.33	0.999 1.61
	125 µg d'HP	125 µg d'HP	62,5 µg d'HP	62,5 µg d'HP
	28.18 430.18	25.32 417.25	34.40 429.80	29.42 415.09
	0.27 1.43	0.26 1.37	0.35 1.87	0.22 1.20
	0.999 2.43	0.999 2.33	0.999 3.19	1.000 2.04
	31,25 µg d'HP	31,25 µg d'HP	15,62 µg d'HP	15,62 µg d'HP
	33.05 419.85	31.22 414.49	35.98 417.71	33.48 422.55
0.21 1.11	0.34 1.79	0.30 1.61	0.52 2.78	
1.000 1.89	0.999 3.05	0.999 2.75	0.998 4.73	
DS 2	250 µg d'HP	250 µg d'HP	187,5 µg d'HP	187,5 µg d'HP
	1.65 376.38	1.45 373.85	2.19 400.73	1.39 377.85
	0.07 0.38	0.15 0.83	0.09 0.48	0.08 0.41
	0.985 0.65	0.917 1.41	0.987 0.81	0.976 0.71
	125 µg d'HP	125 µg d'HP	62,5 µg d'HP	62,5 µg d'HP
	2.90 395.24	2.76 398.36	4.52 398.05	4.09 391.89
	0.09 0.46	0.15 0.82	0.078 0.41	0.07 0.38
	0.993 0.78	0.976 1.39	0.998 0.71	0.998 0.65
	31,25 µg d'HP	31,25 µg d'HP	15,62 µg d'HP	15,62 µg d'HP
	11.56 407.89	11.44 402.44	24.80 406.40	23.39 415.45
0.28 1.51	0.19 0.99	0.19 1.00	0.21 1.12	
0.995 2.57	0.998 1.68	1.000 1.70	0.999 1.91	

Matériel utilisé

Au laboratoire :

- Lecteur de plaque automatique MR5000 (Dynatech).
- Evaporateur centrifuge RC 10.10. (Juan).
- Centrifugeuse C412 (Juan).
- Ordinateur 486sx, Excel 5, Word 6.
- Chaine C.L.H.P. isocratique (phase inverse C18 Lchrospher 4 μ m).

Sur le bateau :

- Profileur granulométrique (mesure de température, densité, fluorescence, salinité charge particulaire selon la profondeur).