

Détection des ciguatoxines : avantages et inconvénients des différentes méthodes biologiques utilisées

par Raphaële Boydron-Le Garrec*, Evelyne Benoit**¹, Martin-Pierre Sauviat***
& Dominique Laurent*

*Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles et Pharmacophores Redox, UMR 152, IRD-Université Paul Sabatier, Centre IRD de Nouméa, BP A5, 98848 Nouméa, Nouvelle Calédonie; **Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire, UPR 9040, Institut Fédératif de Neurobiologie Alfred Fessard, CNRS, bât. 32, 91198 Gif-sur-Yvette cedex, France; ***Laboratoire d'Optique et Biosciences, INSERM U 696-CNRS UMR 7645-X ENSTA, École Polytechnique, 91128 Palaiseau, France.

¹ Auteur à qui la correspondance doit être adressée. E-mail : benoit@ncbm.cnrs-gif.fr

Reçu le 10 janvier 2005

RÉSUMÉ

La ciguatera est une intoxication consécutive à la consommation de poissons des récifs contaminés par des toxines spécifiques, les ciguatoxines, à des niveaux capables d'engendrer chez l'Homme une toxicité par voie orale. Les précurseurs de ces toxines sont les gambiertoxines, produites par des Dinoflagellés du genre *Gambierdiscus*. Ces toxines sont accumulées dans le foie et la chair des poissons brouteurs, herbivores et carnivores, et biotransformées en ciguatoxines plus nocives pour l'Homme. En l'absence de traitement spécifique, la ciguatera reste un problème non seulement de santé publique, mais également socio-économique. La détection des ciguatoxines, au sein des poissons ou de leurs extraits, est donc primordiale et recherchée depuis longtemps. De nombreuses méthodes, biologiques, chimiques ou immuno-chimiques, ont été développées dans ce but. Cette revue est plus particulièrement centrée sur les

méthodes biologiques, développées *in vivo* ou *in vitro*, depuis le test de toxicité aiguë sur Souris, maintenant parfaitement standardisé, jusqu'aux méthodes les plus récentes telles que le test de fixation spécifique sur synaptosomes de Rat. Outre la Souris, le Poulet et la Mangouste ont été encore récemment utilisés, notamment pour des tests préliminaires avant l'extraction des ciguatoxines à partir des poissons. Au contraire, diverses autres méthodes *in vivo*, telles que celles pratiquées sur le Chat, les Culicidés ou les larves de Diptères, furent abandonnées malgré leurs résultats intéressants. Finalement, bien qu'excluant une détection des ciguatoxines "sur le terrain", les tests sur neuroblastomes de Souris et synaptosomes de Rat, nouvelles méthodes réalisées *in vitro*, ont permis un gain considérable tant en sensibilité qu'en spécificité pour détecter les ciguatoxines.

SUMMARY Detection of ciguatoxins: advantages and drawbacks of different biological methods

Ciguatera is a seafood intoxication that results from ingestion of reef fish contaminated with ciguatoxins at levels orally toxic for humans. Precursors of those toxins, gambiertoxins, are produced by benthic dinoflagellates (genus *Gambierdiscus*), and then accumulated and biotransformed by herbivorous and carnivorous fishes into ciguatoxins, more toxic for humans. In the absence of specific treatment, that disease remains a health problem with otherwise adverse socio-economic impacts. Thus a cost-effective means of detecting ciguatoxins in fish has long been searched for. Many assays have been developed, including *in vivo*, *in vitro*, chemical or immunochemical approaches. This review focuses on some biological methods, from the well-

standardised mouse assay to the specific radio-labelled ligand binding assay that is performed on rat brain synaptosomes. In addition to the mouse, the chick and the mongoose were still recently used, in particular for preliminary tests before ciguatoxin extraction from fish, since assays in these animals can directly assay the whole flesh. In contrast, various other *in vivo* methods, such as the kitten, mosquito and diptera larvae assays, were abandoned despite their interesting results. Finally, the mouse neuroblastoma and rat brain synaptosome assays, carried out *in vitro* as alternative approaches to animal-using assays, are highly sensitive and much more specific than the *in vivo* methods to detect ciguatoxins.

INTRODUCTION

La ciguatera est un ichtyosarcotisme, c'est-à-dire une intoxication alimentaire consécutive à l'ingestion d'espèces de poissons des récifs, des mers tropicales et subtropicales, habituellement comestibles et apparemment sains. Ces poissons sont devenus toxiques par accumulation de toxines spécifiques, les « ciguatoxines » (CTXs) dont les précurseurs sont produits par des microalgues benthiques du genre *Gambierdiscus* (Lewis & Holmes, 1993 ; Chinain *et al.*, 1999 ; Lewis *et al.*, 2000). Les CTXs sont des polyéthers, présents dans le foie et les chairs de ces poissons, qui possèdent un squelette polycarboné constitué d'éthers cycliques contigus ; la nature de certains cycles en détermine le type ; les CTXs du Pacifique correspondent aux types I et II alors que celles des Caraïbes sont de type III (voir pour revue Marquais & Sauviat, 1999 ; Lewis *et al.*, 2000). Les CTXs sont de puissants activateurs du canal Na⁺ sensible au potentiel de membrane (CSPS), protéines transmembranaires présentes à la surface de la plupart des cellules excitables (nerveuses, myocardiques ou musculaires) et de certaines cellules non excitables, *e.g.* les cellules gliales (voir pour revue Yu & Catterall, 2003). Les CTXs interagissent spécifiquement avec le site-récepteur 5 de la protéine-canal (Cestèle & Catterall, 2000).

LA DÉTECTION DES CIGUATOXINES : UNE NÉCESSITÉ

En l'absence de traitement spécifique, la ciguatera représente un problème de santé publique qui affecte les régions tropicales et subtropicales mais aussi les régions tempérées en raison de l'importation de poissons destinés à l'alimentation et du développement du tourisme vers ces régions. Cette maladie possède aussi un impact économique et social dans les régions d'endémicité en raison des arrêts de travail chez les personnes intoxiquées (Marquais & Sauviat, 1999) et de l'interdiction d'exporter et de vendre certaines espèces de poissons tropicaux. Ainsi, la détection précoce des CTXs présentes chez les poissons, et responsables de cet ichtyosarcotisme, est nécessaire pour des raisons non seulement sanitaires, mais également économiques.

Depuis les méthodes traditionnelles de détection, de nombreuses techniques – *in vivo*, *in vitro*, chimiques et immunochimiques – ont été proposées dans le but de distinguer les spécimens toxiques des non toxiques ou, plus largement, afin de détecter les CTXs à des fins diverses. Si, actuellement, aucun test fiable n'est disponible sur le marché pour mettre en évidence la toxicité d'un poisson « sur le terrain », certains de ces tests, en particulier les méthodes de détection biologiques, sont ou furent - efficacement utilisés au laboratoire.

C'est par des techniques réalisées *in vivo* que furent mis en évidence les premiers effets des CTXs au laboratoire. La sensibilité aux toxines ciguatières de nombreux modèles animaux – Vertébrés, tels que la Souris,

le Poulet, le Chat ou encore la Mangouste, ou Invertébrés, tels que des Crustacés (*e.g.* *Artemia salina*) ou encore des Insectes (Culicidés, larves de Diptères) – fut ainsi évaluée. Outre la sensibilité de l'espèce aux CTXs, les critères d'évaluation pris en compte sont, pour un test donné, la spécificité des symptômes, la quantification de la réponse de l'animal en terme de toxicité, l'adaptabilité du test à une pratique en routine ainsi que son coût et son éthique.

MODÈLES ANIMAUX UTILISÉS AU LABORATOIRE

Le « test Souris » : un modèle de référence

Le « test Souris » est un test classique d'évaluation de la toxicité aiguë de nombreuses substances, qui a été appliqué à la détection des CTXs dès 1941 (Halstead, 1978) et standardisé quelques années plus tard (voir Banner *et al.*, 1960). Il est actuellement le test de référence pour la détection biologique des CTXs au laboratoire. Le protocole, qui détaille la préparation de l'extrait contenant la ou les toxines, son injection intrapéritonéale (*i.p.*) et la détermination de sa teneur en CTXs, est parfaitement établi (voir Lewis, 1995). Il consiste à injecter l'extrait toxique puis à observer le comportement de la souris jusqu'à sa mort, ou au moins pendant 24 heures, en consignait les modifications du comportement constatées, l'heure de leur apparition ainsi que celle du décès de l'animal.

Pour la ciguatoxine-1 du Pacifique (P-CTX-1), la plus puissante des CTXs isolées à ce jour, les symptômes liés à l'intoxication classiquement observés sont : hypothermie (< 33° C), piloérection, diarrhée, larmolement, hypersalivation, prostration, dyspnée, cyanose et convulsions terminales, la mort étant due à une détresse respiratoire (Lewis, 1995 ; Lewis *et al.*, 2000). Bien que ce tableau soit globalement caractéristique des symptômes produits par l'ensemble des CTXs, certaines particularités existent cependant selon l'origine géographique des CTXs considérées. Ainsi, en plus des symptômes précédemment décrits, les P-CTX-2 et P-CTX-3 provoquent une paralysie progressive de l'arrière-train, et les ciguatoxines des Caraïbes (C-CTXs) une cyanose caractéristique et marquée du pénis, voire un priapisme (Pottier & Vernoux, 2003 ; Pottier *et al.*, 2003). Chez la Souris, les CTXs sont équipotentes qu'elles soient injectées par voie *i.p.* ou administrées oralement (Ogura *et al.*, 1968). Cette propriété permet de les distinguer des autres phyco-toxines en cas de doute sur la spécificité des signes observés.

La teneur en CTXs d'un extrait est exprimée en unité Souris (US ou MU pour « mouse unit ») dont la définition varie selon les auteurs. Selon Yasumoto et Scheuer (1969), l'US est définie par le rapport entre la DL₉₉ (dose létale 99, *i.e.* la dose à administrer pour obtenir une mortalité de 99 % des animaux) de l'extrait toxique (en mg/kg de Souris) et la masse d'extrait (exprimée en mg par g de foie traité). Elle exprime donc la masse de foie

nécessaire pour tuer 99 % des souris (en g de foie/kg de souris) et quantifie la toxicité du foie d'origine. Selon Endean *et al.* (1993), l'US est la masse minimale d'extrait de poissons (en g) nécessaire pour tuer une souris de 20 g dans les 24 h qui suivent son injection i.p.. Pour des raisons d'économie d'extrait, l'utilisation de la DL₅₀ (dose létale 50, *i.e.* la dose nécessaire à administrer pour obtenir une mortalité de 50 % des animaux) fut souvent substituée à celle de la dose létale minimale (DLM) (Chungue *et al.*, 1984). D'autres auteurs (Vernoux, 1994 ; Pottier & Vernoux, 2003) reprennent cette notion et l'expriment en équivalents-gramme de chair d'origine (US/g) rapportés à 1 g de souris (USg/g), valeur qui révèle la comestibilité de la chair pisciaire (une chair étant considérée comme comestible si sa toxicité est inférieure à 0,5 USg/g). Finalement, Lewis (1995) définit l'US par la DL₅₀, obtenue suite à l'injection i.p., rapportée à une souris de 20 g, *i.e.* 1 US (µg) = DL₅₀ (µg/kg)/50. Dans ces conditions, l'US de la P-CTX-1 purifiée a été évaluée à 5 ng.

Chez la Souris, un minimum de deux injections par fraction et par dose est recommandé. Selon Lewis (1995), une diarrhée isolée de tout autre symptôme permet d'estimer la dose injectée à 0,2 US ; une dose non létale après 24 h peut être estimée à 0,5 US si la symptomatologie caractéristique, ainsi qu'une faible prise de poids sur 4 jours, sont constatées. Lorsque le décès survient en moins de 40 minutes (*i.e.* pour une dose supérieure à 10 US), une dose inférieure (d'environ 2 US) doit être injectée. Il est à noter qu'une souris, même asymptotique, ne doit jamais être réutilisée. Dans le cas d'une dose létale, l'heure du décès de l'animal permet un calcul précis de la quantité de CTXs injectée (Fig. 1).

Bien que ce modèle animal présente une haute tolérance aux CTXs (Banner, 1976), le test Souris est toujours utilisé dans les laboratoires, notamment pour quan-

tifier la toxicité d'extraits ciguatériques et assurer le suivi de l'activité ciguatétoxique lors de la purification des toxines (Pottier, 2003). Il faut souligner que les toxicités relatives des P-CTX-1, P-CTX-2 et P-CTX-3, estimées d'après le test Souris, sont comparables à leurs affinités relatives vis-à-vis du site-récepteur 5 du canal Na⁺, déterminées par le test de fixation spécifique sur synaptosomes de Rat (P-CTX-1 > P-CTX-3 > P-CTX-2). Ceci suggère que la toxicité des CTXs chez la Souris est directement liée à leur interaction avec le canal Na⁺ (Lewis *et al.*, 1991). Le test Souris n'est cependant pas le seul test existant, d'autres modèles animaux ont été utilisés dans cette recherche de la toxicité des CTXs.

Le test de gavage chez le Chat

Le test de gavage chez le Chat, bien plus sensible que le test i.p. chez la Souris, a été préconisé par de nombreux auteurs pour la détection des CTXs (voir Halstead, 1978). Après divers tests sur les Mammifères, Oiseaux ou Crustacés, c'est sur le jeune chat que fut pratiquée la « ciguatera expérimentale » (Bagnis & Fevai, 1971). Cette expérience a permis de décrire précisément les signes de l'intoxication chez ce modèle ainsi que l'index de toxicité qui sera la base du test de gavage du Chat. De quelques minutes à dix heures, les symptômes suivants sont observés : perte de vivacité, piloérection, hypersalivation, diarrhée profuse, aqueuse et inconstante, bradycardie initiale suivie rapidement d'une tachycardie, et arythmie. Le tableau neurologique survient en 12 à 24 heures, avec une phase d'incoordination motrice dont les conséquences sont plus ou moins marquées, puis, dans les atteintes les plus graves, une phase de paralysie – allant de parésies à la quadriplégie – touchant les muscles moteurs, mais aussi les muscles masticateurs et releveurs des paupières. Une atteinte des sensibilités (hyperesthésies, dysesthésies de contact, en particulier au

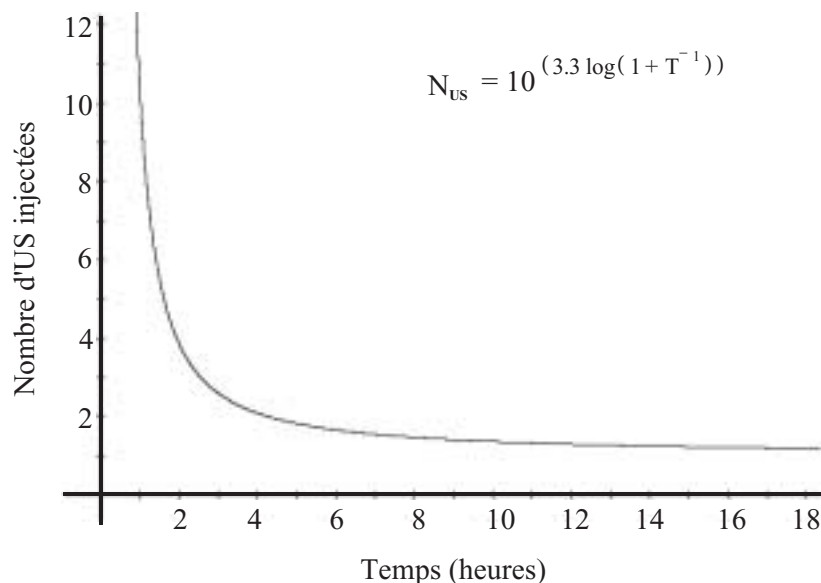


FIG. 1. – Relation entre le nombre d'unités Souris (US) de P-CTX-1 injectées par voie i.p. et le temps de survie chez la Souris. La relation obtenue permet de calculer précisément la dose de P-CTX-1 contenue (exprimée en US, *i.e.* en DL₅₀/20 g de souris) d'après l'heure (T en h) du décès de l'animal : $\log(\text{US}) = A \log(1 + T^{-1})$ où A est égal à 3,3. Il est à noter que dans le cas des P-CTX-2 et P-CTX-3, A est respectivement égal à 2,4 et 3,9. Pour un extrait contenant un mélange de CTXs, A est égal à 2,3. D'après Lewis (1995) et Lewis *et al.* (1991).

TABLEAU I. – Évaluation de la ciguatoxicité en unité Chat (UC) d'un extrait par le test de gavage chez le chaton, selon le degré d'intoxication observé après 48 h [d'après Chanteau (1978) et Bagnis *et al.* (1985)].

Index de toxicité	Toxicité (UC)	Symptômes observés
T0	0	Aucune manifestation anormale.
T1	0,2	Hyperflexion des extrémités au repos, démarche titubante.
T2	0,4	Incoordination motrice lors des déplacements.
T3	0,6	Affaissement/paralysie du train arrière.
T4	0,8	Affaissement/paralysie des trains avant et arrière.
T5	1	Mort de l'animal.

froid), un syndrome hypersécrétoire et une altération de l'état général sont aussi observés. Le test de gavage consiste à faire ingérer à des chatons 10 % de leur poids (80 g/800 g) de chair de poissons cuite (Chanteau, 1978). La dose (en UC pour unité Chat ou CU pour "cat unit") correspondant au degré d'intoxication observé (voir Tableau I) est notée après 48 h. La chair ingérée contient 1 UC si 80 g provoquent la mort de l'animal en 48 h. Il faut cependant noter que le vomissement est une réponse immédiate fréquente à l'intoxication par la CTX chez le Chat. Définie en terme de dose ciguatoxinique nécessaire pour tuer 1 g d'animal, la sensibilité du Chat est environ 150 fois supérieure à celle de la Souris (Bagnis *et al.*, 1985). Rapportée à un animal entier, la dose létale pour un chat de 800 g est environ 4 fois inférieure à celle constatée pour une souris de 20 g. Malgré sa grande sensibilité, le test de gavage chez le Chat n'est plus utilisé car, outre le réflexe de vomissement provoqué par les CTXs, il comporte des inconvénients d'ordres économique et éthique. En effet, le coût et les difficultés d'obtention de cet animal de laboratoire sont des obstacles à son utilisation pour un test de routine. De plus, les "Human Societies in the United States" se sont opposées très tôt à l'utilisation du Chat dans les bioessais (Hashimoto, 1979).

Test de détection des CTXs chez le Poulet

La détection des CTXs a été également effectuée en utilisant le Poulet comme modèle animal, l'extrait étant administré selon différentes voies. La sensibilité du Poulet à la CTX fut comparée à celle de la Souris (Banner *et al.*, 1960; Kosaki *et al.*, 1968). Une bonne corrélation des résultats a été obtenue entre les deux espèces à la fois par la voie i.p. et par la voie intraveineuse (i.v.) via la veine caudale chez la souris ou la veine axillaire de l'aile chez le poulet. La voie i.v. montre cependant une meilleure sensibilité que la voie i.p. et le Poulet s'est avéré légèrement plus sensible que la Souris. Sur ce modèle animal, d'autres auteurs proposèrent un test simple et le comparèrent au test i.p. sur Souris (Vernoux & Lahlou, 1986). Des poulets de 8 à 10 jours (70 à

TABLEAU II. – Échelle de réponse du poussin utilisée pour évaluer la ciguatoxicité d'un extrait (d'après Vernoux & Lahlou, 1986).

0 :	Pas de réponse apparente, température rectale normale (39 à 40° C).
+ 1 :	Perte d'activité, mastication fréquente, paupières lourdes, température abaissée, arrêt de la croissance.
+ 2 :	Aucun réflexe de fuite, jabot mou et dilaté, perte totale d'appétit.
+ 3 :	Démarche chancelante, refus de boire, difficultés respiratoires.
+ 4 :	Station debout impossible, dyspnée, température très abaissée (33 à 34° C).
+ 5 :	Mort de l'animal.

100 g) ayant reçu par voie orale, i.p., sous-cutanée ou intramusculaire, des extraits de poissons développent, en 24 h une symptomatologie proche de celle observée chez la Souris (abaissement de la température corporelle, ataxie, hypersalivation, dyspnée), la mort survenant en quelques heures à 7 jours selon la dose et la voie d'administration. La toxicité des extraits a été évaluée selon une échelle de réponse définie par les auteurs (Tableau II) et la relation entre la durée de vie de l'animal et la dose d'extrait administrée a été établie pour chacune des voies. Les voies parentérales sont en moyenne 1,5 fois plus efficaces que la voie orale. De plus, les DL₅₀ (exprimées en mg d'extrait de poissons/kg d'animal) indiquent une sensibilité par voie orale du Poulet proche de celle du Chat, et 2 à 5 fois supérieure à celle de la Souris après injection i.p. Récemment, cette méthode a été utilisée pour évaluer la toxicité de poissons contenant de faibles quantités de toxine (Pottier & Vernoux, 2003) : les poulets ont reçu *per os* des foies de poissons cuits et réduits en bouillie (10 % de leur poids injectés dans le jabot), les extraits de chair correspondants ayant été administrés par voie i.p. à des souris. Les résultats obtenus montrent que les réponses chez les poulets intoxiqués par voie orale ne varient pas de façon linéaire avec les doses de toxines estimées dans les chairs par le test i.p. Souris. Ils mettent également en évidence une limite de sensibilité en deçà de laquelle aucune réponse du poulet n'est observée. Il est à souligner que l'administration *per os*, qui ne nécessite pas d'autre traitement du matériel pisciaire qu'une cuisson de 15 minutes au bain-marie, se prête bien à une détection en série des CTXs.

Test de gavage chez la Mangouste

Un test de gavage fut également appliqué à la Mangouste. Les animaux (*Herpestes mungo* ou *H. javanicus auro-punctatus*), nourris de chair ou de viscères du poisson à étudier, à raison de 10 % de leur poids corporel, furent observés pendant 48 h. Il est à noter que, contrairement au Chat, la Mangouste ne vomit pas le repas contenant le Poisson toxique (Banner & Boroughs, 1958). Les signes observés furent similaires à ceux observés chez la Souris, correspondant à la symptomatologie classique propre aux mammifères ayant subi une

TABLEAU III. —Évaluation de la ciguatoxicité d'un tissu pisciaire par le test de gavage sur Mangouste [d'après Hokama *et al.* (1977) et Halstead (1978)].

0 :	Pas de réaction.
1 :	Légère faiblesse et flexion des pattes antérieures.
2 :	Légère ataxie motrice, flexion plus prononcée des pattes antérieures et faiblesse des pattes postérieures.
3 :	Ataxie motrice modérée associée à une faiblesse et à une paralysie partielle des membres et de la musculature du corps*.
4 :	Ataxie motrice aiguë et faiblesse extrême, possibilités de mouvement très limitées ou coma.
5 :	Mort de l'animal.

* Une hypersalivation est observée à partir du stade 3.

administration de CTXs (Kosaki *et al.*, 1968). La toxicité des poissons, évaluée selon les réactions essentiellement motrices de la mangouste, est appréciée selon une échelle subjective (Tableau III). C'est par cette méthode que fut évaluée la toxicité des chairs de murènes, dont les extraits de foie furent étudiés sur souris (Yasumoto & Scheuer, 1969). Une corrélation entre les deux tests ne fut obtenue que pour les murènes très toxiques. En effet, les spécimens évalués aux niveaux de toxicité 4 et 5 par le test Mangouste montrèrent une très forte toxicité chez les souris. Par contre, les murènes dont la toxicité était évaluée à un niveau de 0 à 3 furent indifféremment faiblement ou non toxiques pour les souris. Selon Hokama *et al.* (1977), ce test ne donnerait qu'une indication sommaire de la toxicité de l'échantillon étudié en raison de la difficulté parfois rencontrée à distinguer deux niveaux voisins de toxicité. De plus, les mangoustes n'étant pas habituellement élevées en laboratoire, une forte morbidité dans la population et une importante variabilité des réponses ont été notées. Ce test a pourtant été récemment utilisé (Hamilton *et al.*, 2002) pour évaluer la toxicité de la chair de Lutianidés avant extraction. Les quatre spécimens, étudiés à raison de 15 % du poids corporel de la mangouste, ont provoqué une réponse de niveau 4. Le fractionnement ultérieur des extraits a conduit à la purification de la première CTX chez des poissons de l'océan Indien (I-CTX).

BIOESSAIS SUR LES INVERTÉBRÉS : UNE SENSIBILITÉ ENCORE INSUFFISAMMENT EXPLOITÉE ?

Test sur le Culicidé *Aedes aegypti*

Divers Invertébrés, dont la petite taille facilite l'élevage, ont été utilisés pour les tests de bioexpérimentation. C'est ainsi qu'un test sur le Culicidé *Aedes aegypti*, impliqué dans la transmission de la dengue, a été mis au point dans le but de détecter les CTXs chez le Poisson Chirurgien noir (Chungue *et al.*, 1984). Après injection intrathoracique de différentes doses d'extrait (à raison de dix moustiques par dose), la mortalité a été observée

pendant 1 heure et comparée aux résultats obtenus par le test i.p. sur Souris. La comparaison des doses létales montre une corrélation significative entre les deux types de tests. Un avantage du test Moustique par rapport au test Souris réside dans sa bien moindre consommation d'extrait, en raison du faible poids des insectes ($1,6 \pm 0,2$ mg), pour une sensibilité équivalente si l'on compare la DLM chez le mammifère (inférieure à 40 g de chair pour 20 g de souris) à la DL₅₀ chez l'insecte (inférieure à 3,6 mg de chair pour 1,6 g de moustique). Deux autres études (Pompon *et al.*, 1984 ; Bagnis *et al.*, 1985) utilisèrent le test Moustique pour détecter les CTXs à partir d'extraits de poissons d'espèces différentes et le comparèrent aux tests Chat et Souris. Si la première étude confirme une corrélation significative entre les trois tests, la seconde montre, en rapportant les seuils de toxicité au gramme d'animal, que l'insecte est 2 à 9 fois moins sensible à la ciguatoxicité que les mammifères. Le test Moustique a permis néanmoins de mettre en évidence la toxicité des 25 poissons étudiés, à l'origine de 107 cas d'intoxication chez l'Homme, les DL₅₀ obtenues se trouvant corrélées aux proportions de convives intoxiqués par les poissons considérés (Bagnis *et al.*, 1985). Ce test fut utilisé en routine à l'Institut Louis Malardé (Papeete, Tahiti) dans les années 80, remplaçant quasi totalement les tests Souris et Chat. *Aedes aegypti* étant un vecteur potentiel de viroses humaines (*e.g.* la dengue), il fut précisé que ce test pouvait être pratiqué sur d'autres Culicidés (Pompon *et al.*, 1984). Malgré la corrélation des réponses du Moustique avec celles du Chat, de la Souris et de l'Homme, ce test n'est utilisé que par de rares laboratoires (Lewis, 1995) probablement pour des raisons de rareté des élevages de moustiques et d'un manque de familiarité avec la technique.

Le test sur des larves de Diptères

En 1992, Labrousse *et al.* (1992) rapportèrent les résultats préliminaires de l'utilisation de larves de Diptères nécrophages pour la détection rapide de ciguatoxines chez les poissons : la linéarité au cours du temps de la croissance larvaire, observée statistiquement dans un lot de 10 larves déposées sur 5 g de chair de poissons pendant 24 h, est en effet affectée par une alimentation ciguatoxique. De plus, l'évolution du poids des larves (témoin de la croissance) est corrélée aux niveaux de toxicité obtenus par le test Souris (exprimées en US/g de chair, 1 US étant la quantité d'extrait capable de tuer une Souris de 20 g) : les résultats montrent en effet une croissance normale des larves nourries sur des extraits avérés atoxiques sur Souris, un ralentissement de la croissance corrélé au niveau de toxicité de l'extrait, et une mort larvaire dans le cas d'une toxicité supérieure à 0,3 US/g (Tableau IVA). Le seuil de détection indiqué par la pesée des larves était de 0,007-0,015 US/g de chair. Sachant qu'un poisson est toxique pour l'Homme à partir de 0,02 US/g, cette méthode permet donc de détecter un poisson suspect. Ce test fut plus tard repris et affiné (Labrousse & Matile, 1996). Parmi les quatre espèces de Diptères étudiées, deux se montrèrent sensibles à la toxicité d'extraits

TABLEAU IV. – Tests de toxicité sur larves de Diptères. (A) Résultats du test préliminaire [d'après Labrousse *et al.* (1992)]. (B) Effets de la ciguatoxicité sur la croissance des larves [d'après Labrousse & Matile (1996)]. (C) Résultats du test affiné [d'après Labrousse & Matile (1996)].

A

Toxicité sur Souris	Évolution de la croissance des larves sur 24 h ^b	Toxicité estimée pour l'Homme
Atoxique — ^a	Croissance normale	Atoxique
~ 0,15 US/g	Croissance ralentie	Moyennement toxique
> 0,3 US/g	Arrêt de la croissance	Très toxique
	Mort en 3 à 5 h	Hautement toxique

^a Non précisée. ^b Comparée à celle des témoins.

B

ng CTX/g chair ^c	US/g ^d	Évolution de la croissance des larves à 3 h	Poids des larves à 24 h (relatif au poids initial)
0	0	Croissance normale	600 à 1 000 %
0,8	0,12	Arrêt de la croissance	~ 150 %
13	1,97	Mort	~ 80 %

^c Expression de la toxicité des échantillons dépendant du degré de pureté de la CTX considérée. ^d Expression de la toxicité des échantillons en utilisant la valeur de l'US définie par Legrand *et al.* (1991) : 1 US = 6,6 ng de P-CTX-1.

C

Doses inhibitrices de la croissance des larves ^c	ng CTX/g chair	US/g
DI ₂₅	0,075	0,011
DI ₅₀	0,15-0,625	0,022-0,095
DI ₁₀₀ (DL)	> 1	> 0,15

^c DI₂₅, DI₅₀ et DI₁₀₀ : doses inhibant respectivement 25 %, 50 % et 100 % de la croissance des larves ; DL : dose létale.

de murènes quantifiée chez la Souris et le Moustique. Une espèce, *Parasarcophaga argyrostoma*, fut sélectionnée pour étudier quatre espèces de poissons témoins et deux extraits toxiques de murènes (Tableau IVB). Une relation dose-réponse a été établie pour les deux échantillons toxiques, dilués en les mélangeant à de la viande ou de la chair de poisson atoxique : les échantillons contenant plus de 1 ng de CTX par g de chair provoquent une mortalité en 3 h tandis qu'un échantillon dilué à 0,075 ng de CTX par g de chair conduit à une inhibition de 25 % de la croissance larvaire par rapport à celle des témoins. La dose qui inhibe 50 % de la croissance (DI₅₀) varie entre 0,15 et 0,625 ng de CTX par g de chair (Tableau IVC). Avec un seuil de détection de 0,05-0,3 ng CTX/g, soit 0,008-0,045 US/g de chair, la sensibilité de ce test serait

similaire à celle du test Chat (Labrousse & Matile, 1996). Le seuil inférieur de détection indiqué ou la DI₂₅ permettrait donc de détecter les poissons à risque pour l'Homme (*i.e.* de toxicité supérieure à 0,02 US/g). Cependant, dans la zone sensible de détection (25 % à 50 % d'inhibition de la croissance larvaire), le coefficient de variation des poids est de l'ordre de 25 %. De plus, les larves sont sensibles à des toxines autres que les CTXs, telles que l'acide okadaïque que peuvent contenir les extraits (Labrousse & Matile, 1996). Il apparaît donc qu'en l'absence d'une symptomatologie propre aux CTXs, ce test, bien que sensible, simple à mettre en œuvre et éthique, ne soit cependant pas spécifique.

Le test sur l'Écrevisse rouge *Procambarus clarkii*

L'Écrevisse rouge *Procambarus clarkii* et la «chevette» *Macrobrachium rosenbergi*, crevette géante plus disponible en milieu insulaire, furent également utilisées pour apprécier la cytotoxicité d'un homogénat de foie de poisson, injecté en intramusculaire, au niveau de la face ventrale du second tergite abdominal, à raison de 0,33 % du poids du crustacé (Keene *et al.*, 1968). Les effets observés permirent d'établir une échelle de réponse définissant les niveaux de toxicité de l'extrait (Tableau V). Cependant, des faux-positifs constatés sur ce test, spécialement avec les poissons herbivores, conduisirent à son abandon (Banner, 1976).

TABLEAU V. – Échelle d'évaluation de la ciguatoxicité d'un extrait testé sur l'Écrevisse rouge *Procambarus clarkii* [d'après Keene *et al.* (1968)].

- | | |
|-----|---|
| 0 : | Pas de réaction. |
| 1 : | Convulsions transitoires avec flexion abdominale. |
| 2 : | Perte de la position agressive des pinces. |
| 3 : | Posture maladroite et soubresauts des appendices. |
| 4 : | Perte du réflexe de redressement ^a . |
| 5 : | Agonie et mort de l'animal. |

^a Perte constatée lorsque l'écrevisse, retournée avec une tige, ne s'est pas redressée après 2 minutes. Le temps moyen de perte de ce réflexe permettrait de distinguer les poissons modérément toxiques des poissons fortement toxiques.

Le test sur des larves du Crustacé *Artemia salina*

Finalement, un autre test a été développé sur les larves d'*Artemia salina* ou Artémie (Swift & Swift, 1993), Invertébré plus généralement utilisé pour explorer la toxicité aiguë de pesticides, de métaux lourds et autres toxiques de l'environnement. Après que les larves fraîchement écloses aient été exposées à l'extrait de poisson suspect pendant 24 h, la mortalité larvaire est mesurée. Un poisson toxique provoque 50 à 100 % de mortalité tandis qu'un spécimen non toxique ne tue pas plus de 5 % de larves. Cependant, là encore, ce modèle n'a pas été validé à la suite d'une étude qui n'a mis en évidence aucun effet attribuable aux CTXs mais a révélé l'exis-

tence de faux-positifs dus à l'effet toxique du Tween™ 60 utilisé pour émulsionner l'extrait (Lewis, 1995).

TESTS *IN VITRO* : SPÉCIFICITÉ ET SENSIBILITÉ

D'autres tests, développés *in vitro*, sont fondés sur les interactions qui existent entre les CTXs et le site-récepteur 5 des CSSP. De nombreuses études montrent que les CTXs observées dans l'océan Pacifique (P-CTXs), les Caraïbes (C-CTXs) et l'océan Indien (I-CTXs), en se liant aux CSSP, sont de puissants activateurs de ces canaux (Bidard *et al.*, 1984; Lewis *et al.*, 1991; Hamilton *et al.*, 2002; Pottier *et al.*, 2003). Certains tests *in vitro* exploitent donc les effets spécifiques des toxines mis en évidence au niveau cellulaire et moléculaire. C'est le cas du test de cytotoxicité développé sur des neuroblastomes de Souris.

Le test de cytotoxicité sur les neuroblastomes de Souris

La vératridine, bien connue pour activer les CSSP en interagissant avec leur site-récepteur 2, provoque, sur différentes souches de neuroblastomes et de cellules musculaires en culture, une entrée d'ions Na^+ qu'il est possible de mettre en évidence si l'efflux de Na^+ dû à la Na^+/K^+ -ATPase, est bloqué par l'application conjointe d'ouabaïne (Catterall & Nirenberg, 1973). Cette propriété a été exploitée pour détecter des toxines inhibitrices des CSSP, la tétrodotoxine (TTX) issue du « fugu » ou encore la saxitoxine (STX) et ses congénères responsables du « Paralytic Shellfish Poisoning » (Kogure *et al.*, 1988). Ces toxines préviennent en effet l'arrondissement et/ou la mort des neuroblastomes de Souris Neuro-2A produits par l'application de concentrations cytotoxiques d'ouabaïne et de vératridine, effet qui est évalué semi-quantitativement par une observation microscopique des cellules. Manger *et al.* (1993) élargirent ce test à la détection des toxines inhibitrices ou activatrices des CSSP. La mortalité d'une partie des neuroblastomes, provoquée par l'ouabaïne et la vératridine, est prévenue par les toxines inhibitrices des CSSP et est majorée par les toxines activatrices de ces canaux, telles que les brevétoxines (PbTx) et les CTXs. Il est à souligner qu'une interaction allostérique positive existe entre les site-récepteurs 2 et 5 des CSSP (Dechraoui-Bottein, 1999). L'affinité de l'une des toxines pour son site-récepteur est ainsi augmentée en présence de l'autre. De plus, ce test est associé à une méthode colorimétrique qui permet de quantifier précisément et rapidement la viabilité cellulaire (Mosmann, 1983). Brièvement et selon la méthode approuvée par l'« Association of Official Analytical Chemists » (Manger *et al.*, 1995), les Neuro-2A sont mis en culture pendant 24 h sur une microplaque et chaque série de puits reçoit ensuite des concentrations précises d'ouabaïne et de vératridine, ainsi que différentes concentrations de l'extrait à étudier ou de diverses toxines (PbTx,

CTXs) purifiées. Les microplaques sont alors mises à incuber pendant 4 à 22 h, et leur contenu révélé à l'aide du MTT (3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényl-tétrazolium) dont la réduction par les mitochondries actives (*i.e.* des cellules viables) conduit à la formation du formazan correspondant, composé violet absorbant à 570 nm. Après une incubation de 15 minutes et la solubilisation des cristaux de formazan dans du diméthylsulfoxyde, la viabilité cellulaire est estimée en mesurant la densité optique de la microplaque à 570 nm (la référence étant à 630 nm) grâce à un spectrophotomètre. La sensibilité de cette méthode appliquée à la détection des CTXs est inférieure ou égale au picogramme. En effet, les DI_{50} (doses inhibant 50 % de la viabilité des cellules traitées par l'ouabaïne et la vératridine) de la P-CTX-1 sont de 1 pg pour un contact de 7 h et de 0,25 pg après 24 h. Pour la P-CTX-3, ces valeurs sont respectivement de 3 et 1 pg. La corrélation de ce test avec le test Souris établi sur des extraits de poissons des Caraïbes montre la limite de détection de ce dernier puisque le test cellulaire est 10^4 fois plus sensible (Lewis, 1995). Par ailleurs, une tolérance élevée des cellules a été observée vis-à-vis des solutions utilisées pour obtenir les extraits.

Le test d'hémolyse des érythrocytes humains

Les propriétés lytiques de fortes doses d'extraits scaritoxiniques (préparés à partir de la chair de Scaridés) et ciguatoxiniques, partiellement purifiés, vis-à-vis des globules rouges (GR) de Lapin furent mises en évidence dès 1977 (Chungue, 1977). Ces observations, confirmées dix ans plus tard pour des extraits bruts de *Gambierdiscus toxicus* et de *Ctenochaetus strigosus* (Hokama *et al.*, 1987), ont cependant été attribuées, dans une seconde étude, à la maïtotoxine (Miyahara *et al.*, 1987). À la suite des travaux de Manger *et al.* (1993), un test basé sur la lyse des GR de *Tilapia* fut mis au point (Shimojo & Iwaoka, 2000), montrant que l'hémolyse, provoquée soit par la co-application d'ouabaïne et de vératridine soit par divers extraits marins, est prévenue par les toxines inhibitrices des CSSP (TTX, STX, et apparentées). Une activité hémolytique de la P-CTX-1 pure a été également mise en évidence sur les GR humains (Boydron *et al.*, 2002). Cependant, l'hémolyse, tardive, se produit à des doses très élevées de CTX, preuve de la faible sensibilité qu'aurait un test fondé sur cette activité hémolytique. De plus, par leur interaction avec les lipides membranaires, les substances lipidiques extraites avec les CTXs seraient fortement susceptibles d'interférer, en produisant une hémolyse non spécifique.

Le test de déformation des érythrocytes de Grenouille

La P-CTX-1 (1 nM) provoque le gonflement des érythrocytes de Grenouille. La forme elliptique de ces derniers permet d'apprécier le degré de gonflement apparent en mesurant, à l'aide d'un microscope (grossissement $\times 350$), les variations des dimensions apparentes du grand axe et du petit axe de l'ellipse. La longueur de ces deux paramètres est augmentée en présence de concen-

trations nanomolaires de P-CTX-1. Cet effet est insensible à la TTX et nécessite la présence d'ions Ca^{2+} dans le milieu extérieur pour se développer ce qui suggère que les canaux Ca^{2+} participent à son développement (Boydron *et al.*, 2001). Bien que ce test soit facile à mettre en œuvre et relativement sensible (sensibilité de l'ordre de 0,5 nM de P-CTX-1), il n'est pas adapté à la détection des CTXs présentes dans les chairs de poissons. Néanmoins, nos travaux récents indiquent que ce test se révèle utile pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires des effets des CTXs sur les globules rouges.

Le test « luciférase » sur les neuroblastomes de souris transfectées

Fondée sur le test de Manger *et al.* (1993), une autre méthode a été mise au point sur des neuroblastomes de Souris. Exploitant le fait que les CTXs, par l'activation des CSSP, induisent chez la Souris l'expression du proto-oncogène *c-fos* (Peng *et al.*, 1995; Fairey *et al.*, 2001), Fairey *et al.* (1997) firent exprimer de façon stable, par un clone de Neuro-2A, la construction "*c-fos*-luciférase" où le gène rapporteur de la luciférase est placé sous le contrôle du promoteur *c-fos*. L'activité enzymatique de la luciférase, qui traduit donc l'expression de *c-fos*, peut être facilement mise en évidence puisque la réaction d'oxydation de son substrat, la luciférine, s'accompagne, pendant un temps très court, d'une émission de lumière quantifiable par luminométrie. Des modifications inhérentes à l'optimisation de la culture des cellules transfectées (N2AC) et de l'induction de l'activité de la luciférase par la PbTx-1, ou à la lecture par luminométrie, furent apportées au protocole de Manger *et al.* (1995). Les cellules ont été mises en culture dans une microplaque à luminescence et la composition du milieu d'incubation ainsi que les concentrations en ouabaine et véatrindine ont été ajustées. Après l'action des toxines, les cellules sont lysées et mises au contact du réactif contenant la luciférine. L'émission de lumière est alors aussitôt mesurée. Bien que la méthode n'ait pas été appliquée à des extraits pisciaires, les résultats obtenus avec la PbTx-1, la CTX-1 et la CTX-3 sont prometteurs. En effet, les DE_{50} (doses efficaces augmentant de 50 % l'activité de la luciférase) sont équivalentes aux DI_{50} déterminées par le test de Manger *et al.* (1993) et le test de fixation spécifique décrit ci-dessous : elles sont de 4,6 ng/mL pour la PbTx-1 et de 3 pg/mL pour les deux CTXs étudiées. Il est à souligner que, inhibée par la STX, l'augmentation de l'activité de la luciférase produite par ces toxines résulte bien d'une interaction de celles-ci avec les CSSP.

Le test de fixation spécifique sur les synaptosomes de Rat

Le site-récepteur 5 fixant les CTXs a été identifié au niveau de la sous-unité α formant le CSSP : il est situé au niveau des segments S6 du domaine D1 et S5 du domaine D4 (Cestèle & Catterall, 2000). L'affinité des CTXs pour ce site est très élevée puisque les constantes d'inhibition de la fixation de 1 nM de $[\text{H}^3]\text{-PbTx-9}$ sont

respectivement de 41 et 470 pM pour les P-CTX-1 et P-CTX-3C (Dechraoui *et al.*, 1999). Cette caractéristique est mise à profit par le test de fixation spécifique sur synaptosomes de Rat pour détecter et doser les CTXs au sein d'un extrait. Ce test, souvent dénommé "*RLB assay*", acronyme anglophone de "*Radio-labelled Ligand Binding assay*", fut mis au point en 1986 par les travaux de l'équipe de Poli (Van Dolah, 1996) et utilisé par Lewis *et al.* (1991). Son principe repose sur la fixation quasi-irréversible des CTXs sur le site-récepteur 5 des CSSP, site auquel se lie également les PbTx mais avec une plus faible affinité. Plus précisément, ce test mesure l'inhibition compétitive exercée par les CTXs sur la fixation d'une brévéttoxine donnée, préalablement radiomarquée et liée à ce site. La quantité de PbTx déplacée par les CTXs (mesurée par la diminution de la radioactivité) est proportionnelle à la concentration de CTXs appliquée. Brièvement, à partir de cerveaux de rat fraîchement homogénéisés, les boutons synaptiques (ou synaptosomes) sont isolés des axones neuronaux et autres éléments cellulaires par des centrifugations différentielles successives. Dans des conditions adaptées à la réaction de fixation, les préparations membranaires sont mises sur une microplaque à scintillation en présence d'une PbTx marquée et du compétiteur à étudier (extrait ou standard ciguatoxinique), les brévéttoxines tritiées $[\text{H}^3]\text{-PbTx-3}$ et $[\text{H}^3]\text{-PbTx-9}$ étant préparées par la réaction du borohydrure de sodium enrichi en ^3H (NaB^3H_4) sur la PbTx-2 ou obtenues sur commande. Après incubation, la microplaque est « lavée » sur un filtre en fibre de verre dont, après séchage, la radioactivité est mesurée grâce à un compteur à scintillation (Van Dolah, 1996; Hamilton *et al.*, 2002). La sensibilité de cette méthode, égalant celle du test neuroblastomes, est 10^4 fois supérieure à celle du test Souris (Hamilton, 2002) avec des CI_{50} (concentrations inhibant 50 % de la fixation de la brévéttoxine) de l'ordre de 0,1 à 10 nM pour les P-CTXs (Dechraoui *et al.*, 1999). Divers travaux ont montré l'aptitude de ce test à détecter et doser les CTXs au sein d'extraits de poissons (Dechraoui-Bottein, 1999; Hamilton *et al.*, 2002; Pottier *et al.*, 2003). Il est à souligner que la matrice co-extraite avec les CTXs n'exerce pas d'influence significative sur leur fixation spécifique (Dechraoui-Bottein, 1999) : la courbe de compétition et la CI_{50} d'un extrait de murène non toxique, chargé de doses croissantes de P-CTX-1, ne diffèrent pas de celles d'une gamme de concentrations de toxine pure. Ce test, à la fois hautement spécifique et très sensible, est cependant très coûteux et donc peu adapté à une détection de routine chez des poissons suspectés d'être ciguatoxiques. Il fut utilisé avec succès pour suivre l'activité ciguatoxinique d'extraits toxiques lors de leur fractionnement : effectué sur les diverses fractions d'un éluat d'HPLC ("*high-performance liquid chromatography*"), il permet de repérer les diverses CTXs séparées en reliant les pics de toxicité à ceux du chromatogramme. Ceci étant, certaines C-CTXs, mises en évidence par Pottier *et al.* (2003), ne montrent aucune activité sur ce test. Il est possible que cette particularité soit imputable aux faibles quantités de toxines isolées.

QU'EN EST-IL DES MÉTHODES IMMUNOLOGIQUES ET CHIMIQUES ?

Parallèlement aux méthodes biologiques, certaines études ont plus spécifiquement porté sur le développement d'essais immunologiques pour la détection des poissons ciguatoxiques. Ces essais, bien que présentés comme prometteurs, soulèvent de nombreuses controverses. C'est ainsi qu'un kit de détection des poissons ciguatoxiques, dénommé "Cigua-Check", est proposé par "Oceanit Test Systems Inc." comme possédant une sensibilité (probabilité pour un poisson toxique de fournir un résultat positif) de 92,3 % et une spécificité (probabilité pour un poisson non toxique de donner un résultat négatif) de 85,7 %. Ce test utilise un anticorps monoclonal dirigé contre la P-CTX-1 purifiée à partir de murènes du Pacifique. Cependant, les résultats des essais scientifiques de ce kit ne font pas l'unanimité puisque certains montrent que sa sensibilité et sa spécificité sont respectivement de 33-57 % et de 58-77 % (voir Benoit & Molgò, 2000). De plus, une étude récente, destinée à standardiser les conditions d'utilisation et à évaluer le test "Cigua-Check", révèle, d'une part, une instabilité du kit dans les conditions préconisées par le fabricant (à température ambiante jusqu'à la date d'expiration) et, d'autre part, une mauvaise corrélation ($r = 0,21-0,41$) entre des doses croissantes de P-CTX-1 pure étudiées et les réponses obtenues (Oliver, 2004a, 2004b). Il semble donc que le kit "Cigua-Check" ne soit pas, pour l'instant, convenable pour détecter les Poissons ciguatoxiques, comme cela l'avait été également conclu au préalable pour le kit "Ciguatect" (Dickey *et al.*, 1994).

Finalement, la détection des CTXs peut aussi se faire par l'analyse chimique, basée sur la chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC/MS ou HPLC/MS/MS). Du fait de l'appareillage onéreux et encombrant nécessaire, ces méthodes ne sont applicables qu'au laboratoire mais sont d'une grande sensibilité puisqu'elles permettent de détecter les CTXs à des niveaux inférieurs au ppb (partie par billion, *i.e.* ng par g de chair), au sein d'extraits plus ou moins purifiés (Lewis *et al.*, 1998, 1999a, 1999b). De plus, ces méthodes sont fondées sur une détection chimique et non sur une évaluation de l'activité toxinique, ce qui en fait les seules techniques permettant de distinguer les ciguatoxines entre elles et de les purifier. Elles ont ainsi permis l'identification de nouvelles CTXs, prérequis indispensable au développement de techniques immunologiques adaptées.

CONCLUSIONS

La détection à la fois sensible et spécifique des CTXs rencontre de nombreux obstacles cumulatifs. En effet, dans la chair des poissons, les quantités de CTXs qui provoquent une intoxication chez l'Homme sont extrêmement faibles (de l'ordre de 50 à 100 pg d'équivalents P-CTX-1 par g de chair). Pour qu'une méthode puisse les

détecter de manière fiable et répétitive, il faut que son seuil de sensibilité soit inférieur à ces valeurs et que, de plus, elle puisse tenir compte de la multiplicité des CTXs dont les formes structurales sont variées. Par ailleurs, la mise au point de méthodes de détection efficaces repose sur l'obtention d'étalons purifiés. Or, les ciguatoxines, si elles sont maintenant purifiées et commencent à être synthétisées, ne sont encore que très difficilement disponibles à l'état pur. La détection des CTXs contenues chez les poissons demeure, de ce fait, un problème non résolu.

En ce qui concerne les méthodes biologiques, il n'existe actuellement aucun test de détection préventive des CTXs qui soit directement utilisable sur la chair des poissons, officiellement validé, simple, rapide, fiable, peu coûteux et transposable à grande échelle. La méthode de détection *in vivo* la plus largement répandue et validée, à l'heure actuelle, est le test Souris dont le protocole et l'exploitation des résultats sont maintenant bien définis. Ce test permet de quantifier la toxicité d'un extrait avec précision et son utilisation standardisée autorise la comparaison des résultats. Les tests de gavage (Chat, Poulet, Mangouste, larves de Diptères) sont les seuls tests adaptés à une évaluation de la ciguatoxicité sur les tissus pisciaires. Ils ne sont cependant plus ou très peu utilisés. Malgré leurs multiples avantages (rapidité, sensibilité, faible coût), les tests utilisant le Moustique et les larves de Diptères n'ont pas été retenus. Les méthodes réalisées *in vitro*, sont à la fois plus éthiques, bien plus sensibles et bien plus spécifiques. En particulier, il faut noter que les tests sur les neuroblastomes de Souris et les synaptosomes de Rat, permettent la détection de quelques picogrammes de CTXs et une quantification très précise de la toxicité. Cependant, ces tests nécessitent une étape préalable d'extraction voire de purification des toxines, des équipements parfois onéreux, et un personnel formé à leur pratique. Bien que ces méthodes soient d'un grand intérêt pour la recherche dans le domaine concernant l'étude de la ciguatera, aucune d'elles n'est adaptée à une détection « sur le terrain » des poissons à risque, ni même applicable à une détection de masse sur des extraits bruts.

BIBLIOGRAPHIE

- Bagnis R. & Fevai G., La ciguatera féline expérimentale à Tahiti. *Rev. Méd. Vét.*, 1971, 122, 629-637.
- Bagnis R., Chanteau S., Chungue E., Drollet J. H., Legrand A.-M., Pompon A., Prieur C., Roux J. & Tetaria C., Comparison of the cat bioassay, the mouse bioassay and the mosquito bioassay to detect ciguatoxicity in fish. In : Gabrie C., Toffart J.L. & Salvat B., *Proc. Fifth Int. Coral Reef Cong.*, June 27-May 1 1985, Antenne Museum-EPHE, Tahiti, French Polynesia, 1985, 4, pp. 491-496.
- Banner A. H., Ciguatera: a disease from coral reef fish. In : Jones O. A. & Endean R., *Biology and Geology of Coral Reefs*, Academic Press, New York, 1976, Volume III, *Biology 2*, pp. 177-213.
- Banner A. H. & Boroughs H., Observations on toxins of poisonous fishes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1958, 98, 776-778.

- Banner A. H., Scheuer P. J., Sasaki S., Helfrich P. & Alender C. B., Observations on ciguatera-type toxin in fish. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1960, 90, 770-787.
- Benoit E. & Molgó J., Ciguatera et test rapide : pas encore de solution à ce jour. *Bull. Soc. Fr. Ichtyol.*, SFI-Infos, 2000, 13, 6.
- Bidard J. N., Vijverberg H. P., Frelin C., Chungue E., Legrand A.-M., Bagnis R. & Lazdunski M., Ciguatoxin is a novel type of Na⁺ channel toxin. *J. Biol. Chem.*, 1984, 259, 8353-8357.
- Boydron R., Laurent D. & Sauviat M. P., Un test biologique destiné à identifier les principes actifs des plantes utilisées comme remèdes traditionnels contre l'intoxication ciguaterique en Nouvelle-Calédonie. In : Bon C., Goudey-Perrière F., Poullain B., Puiseux-Dao S., *Rencontres en toxicologie : explorer, exploiter les toxines et maîtriser les organismes producteurs*, Editions scientifiques et médicales Elsevier, Paris, 2001, pp. 63-66.
- Boydron R., Sauviat M.-P., Benoit E., Molgó J. & Laurent D., L'hémolyse des érythrocytes humains par la P-CTX-1 : une méthode pour évaluer le potentiel thérapeutique des remèdes traditionnels utilisés en Nouvelle-Calédonie pour traiter la ciguatera. In : Goudey-Perrière F., Bon C., Puiseux-Dao S. & Sauviat M.-P., *Rencontres en toxicologie : toxines et recherches biomédicales*, Editions scientifiques et médicales Elsevier, Paris, 2002, pp. 101-104.
- Catterall W. A. & Nirenberg M., Sodium uptake associated with activation of action potential ionophores of cultured neuroblastoma and muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1973, 70, 3759-3763.
- Cestèle S. & Catterall W. A., Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie*, 2000, 82, 883-892.
- Chanteau S., Radio-immunologie et immunofluorescence appliquées à la ciguatera. Rapport pour la Commission du Pacifique Sud, Rapport de mission à Honolulu (12 mars-1^{er} avril 1978), Institut de Recherches Médicales Louis Malardé, Papeete, 1978, 13 p.
- Chinain M., Faust M. A. & Pauillac S., Morphology and molecular analyses of three toxic species of *Gambierdiscus* (Dinophyceae): *G. pacificus*, sp. nov., *G. australes*, sp. nov., and *G. polynesiensis*, sp. nov. *J. Phycol.*, 1999, 35, 1282-1296.
- Chungue E., Le complexe toxinique des poissons perroquets. Thèse de Doctorat d'État de Chimie, Université de Montpellier, 1977, 94 p.
- Chungue E., Bagnis R. & Park F., The use of mosquitoes (*Aedes aegypti*) to detect ciguatoxin in surgeon fishes (*Ctenochaetus striatus*). *Toxicon*, 1984, 22, 161-164.
- Dechraoui M.-Y., Naar J., Pauillac S. & Legrand A.-M., Ciguatoxins and brevetoxins, neurotoxic polyether compounds active on sodium channels. *Toxicon*, 1999, 37, 125-143.
- Dechraoui-Bottein M.-Y., Étude du mode d'action des ciguatoxines, biotoxines marines responsables de la ciguatera : comparaison aux brevétotoxines et application à la détection des poissons toxiques. Thèse de Doctorat en Sciences, Université de la Polynésie française, 1999, 126 p.
- Dickey R. W., Granade H. R. & McClure F. D., Evaluation of a solid-phase immunobead assay for detection of ciguatera-related biotoxins in caribbean finfish. *Mem. Queensl. Mus.*, 1994, 34, 481-488.
- Endean R., Griffith J. K., Robins J. J. & Monks S. A., Multiple toxins in a specimen of a narrow-barred spanish mackerel, *Scomberomus commersoni*. *Toxicon*, 1993, 31, 195-204.
- Fairey E. R., Edmunds J. S. G. & Ramsdell J. S., A cell-based assay for brevetoxins, saxitoxins, and ciguatoxins using a stably expressed *c-fos*-luciferase reporter gene. *Anal. Biochem.*, 1997 251, 129-132.
- Fairey E. R., Bottein-Dechraoui M.-Y., Sheets M. F. & Ramsdell J. S., Modification of the cell based assay for brevetoxins using human cardiac voltage dependent sodium channels expressed in HEK-293 cells. *Biosens. Bioelectron.*, 2001, 16, 579-586.
- Halstead B. W., Poisonous and venomous marine animals of the world (Revised Edition), The Darwin Press Inc., Princeton, USA, 1978, 283 p.
- Hamilton B., Analysis and characterisation of ciguatoxins present in fish of the Indian Ocean, the Pacific Ocean, and the Caribbean Sea. Doctor of Philosophy (Ph.D.) Thesis, Department of Chemistry, Brisbane, The University of Queensland, 2002, 191 p.
- Hamilton B., Hurbungs M., Vernoux J.-P., Jones A. & Lewis R. J., Isolation and characterisation of Indian Ocean ciguatoxin. *Toxicon*, 2002, 40, 685-693.
- Hashimoto Y., Marine toxins and other bioactive marine metabolites. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan, 1979, 379 p.
- Hokama Y., Banner A. H. & Boylan D. B., A radioimmunoassay for the detection of ciguatoxin. *Toxicon*, 1977, 15, 317-325.
- Hokama Y., Nakagawa L., Kobayashi M., York R., Kurihara J. & Miyahara J., The similarity between cultured *Gambierdiscus toxicus* (T39) and flesh extract of *Ctenochaetus strigosus* (herbivore). In : Gopalakrishnakone P. & Tan L. K., *Progress in Venom and Toxin Research*, National University of Singapore, 1987, pp. 356-362.
- Keene E., Randall H. A. & Banner A. H., A new field and screening bioassay for ciguatera (abstract). Seminar on Ichthyosarcotism, August 16-22 1968, Papeete, French Polynesia. Commission du Pacifique Sud, Nouméa, Nouvelle-Calédonie, 1968, Working Paper N° 18, 2 p.
- Kogure K., Tamplin M., Simudu U. & Colwell R. R., A tissue culture assay for tetrodotoxin, saxitoxin and related toxins. *Toxicon*, 1988, 26, 191-197.
- Kosaki T. I., Stephens B. J. & Anderson H. H., Marine toxins from the Pacific III. Comparative bio-assay of ciguatoxin(s) in the mouse and chicken. *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, 1968, 11, 126-128.
- Labrousse H. & Matile L., Toxicological biotest on *Diptera* larvae to detect ciguatoxins and various other toxic substances. *Toxicon*, 1996, 34, 881-891.
- Labrousse H., Pauillac S., Legrand A.-M. & Avrameas S., Utilisation de larves de Diptères pour la détection de poissons ciguatoxiques. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 1992, 85, 529-529.
- Legrand A.-M., Pauillac S. & Chinain M., Ciguatera in French Polynesia. In : Debitus C., Amade P., Laurent D. & Cosson J.-P., *Actes du Troisième symposium sur les substances naturelles d'intérêt biologique de la région Pacifique-Asie*, 20-26 août 1991, Nouméa, Nouvelle-Calédonie, 1991, pp. 319-325.
- Lewis R. J., Detection of ciguatoxins and related benthic dinoflagellate toxins: *in vivo* and *in vitro* methods. In : Hallegraef G. M., Anderson D. M. & Cembella A. D., *Manual on Harmful Marine Microalgae*, Intergovernmental Oceanographic Commission (IOC) Manuals and Guides N° 33, UNESCO, France, 1995, pp. 135-161.
- Lewis R. J. & Holmes M. J., Origin and transfer of toxins involved in ciguatera. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 1993, 106, 615-628.
- Lewis R. J., Sellin M., Poli M. A., Norton R. S., MacLeod J. K. & Sheil M. M., Purification and characterization of ciguatoxins from moray eel (*Lycodontis javanicus*, Muraenidae). *Toxicon*, 1991, 29, 1115-1127.
- Lewis R. J., Jones A., Vernoux J.-P. & Marquis M., Sensitive detection of multiple ciguatoxins by HPLC/MS/MS. In : Reguera B., Blanco J., Fernandez M. L. & Wyatt T., *Harmful Algae*, Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiagode de Compostela, Spain, 1998, pp. 523-524.
- Lewis R. J., Jones A. & Vernoux J.-P., HPLC/mass spectrometry and HPLC/MS/MS methods for the detection of multiple ciguatoxins. In : Séret B. & Sire J.-Y., *Proc. 5th Indo-Pacif.*

- Fish Conf.*, November 3-8 1997, Noumea, New Caledonia, *Soc. Fr. Ichtyol.*, Paris, 1999a, pp. 739-744.
- Lewis R. J., Jones A. & Vernoux J.-P., HPLC/tandem electrospray mass spectrometry for the determination of sub-ppb levels of pacific and caribbean ciguatoxins in crude extracts of fish. *Anal. Chem.*, 1999b, *71*, 247-250.
- Lewis R. J., Molgó J. & Adams, D. J., Ciguatera toxins: pharmacology of toxins involved in ciguatera and related fish poisonings. In: Botana L. M., *Seafood and freshwater toxins Pharmacology, Physiology and Detection*, M. Dekker Inc, New York and Basel., 2000, pp. 419-447.
- Manger R., Leja L. S., Lee S. Y., Hungerford J. & Wekell M., Tetrazolium-based cell bioassay for neurotoxins active on voltage-sensitive sodium channels: semiautomated assay for saxitoxins, brevetoxins, and ciguatoxins. *Anal. Biochem.*, 1993, *214*, 190-194.
- Manger R. L., Leja L. S., Lee S. Y., Hungerford J. M., Hokama Y., Dickey R. W., Granade H. G., Lewis R., Yasumoto T. & Wekell M., Detection of sodium channel toxin: directed cytotoxicity assays of purified ciguatoxins, brevetoxins, saxitoxins, and seafood extracts. *J. AOAC Int.*, 1995, *78*, 521-527.
- Marquais M. & Sauviat M.-P., Effet des ciguatoxines sur le système cardio-vasculaire. *J. Soc. Biol.*, 1999, *193*, 495-504.
- Miyahara J. T., Kamibayashi C. K., Shirai L. K. & Hokama Y., The similarity of toxins in *Ctenochaetus strigosus* and cultured *Gambierdiscus toxicus*. In: Gopalakrishnakone P. & Tan L. K., *Progress in Venom and Toxin Research*, National University of Singapore, 1987, pp. 363-371.
- Mosmann T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods*, 1983, *65*, 55-63.
- Ogura Y., Nara J. & Yoshida T., Comparative pharmacological actions of ciguatoxin and tetrodotoxin, a preliminary account. *Toxicon*, 1968, *6*, 131-140.
- Oliver L., Preliminary results of the evaluation of the Cigua-Chech® test-kit using australian fish. In: Wint S. M. E., *Regional Training Workshop on Marine Toxins*, June 17-22 2002, Suva, Fiji Islands, Science and Technology Division, Commonwealth Secretariat, London, United Kingdom, 2004a, pp. 1-8.
- Oliver L., Preliminary results of the evaluation of an immunoassay-based ciguatoxin test-kit using australian fish. In: Wint S. M. E., *Regional Training Workshop on Marine Toxins*, June 17-22 2002, Suva, Fiji Islands, Science and Technology Division, Commonwealth Secretariat, London, United Kingdom, 2004b, pp. 132-135, communication orale.
- Peng Y. P., Taylor T. B., Finch R. E., Moeller P. D. & Ramsdell J. S., Neuroexcitatory actions of ciguatoxin on brain regions associated with thermoregulation. *NeuroReport*, 1995, *6*, 305-309.
- Pompon A., Chungue E., Chazelet I. & Bagnis R., Ciguatera : une méthode rapide, simple et fiable de détection de la ciguatoxine. *Bull. World Health Organ.*, 1984, *62*, 639-645.
- Pottier I., La ciguatera aux Antilles : épidémiologie, analyse de la C-CTX-1 et étude de la diversité des ciguatoxines dans les poissons toxicophores. Thèse de Doctorat d'Université en Physiologie, Biologie des Organismes, Populations, Interactions, Université de Caen, 2003, 271 p.
- Pottier I. & Vernoux J.-P., Évaluation de la ciguatoxicité de poissons des Antilles par les bioessais souris et poussin. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 2003, *96*, 24-28.
- Pottier I., Hamilton B., Jones A., Lewis R. J. & Vernoux J.-P., Identification of slow and fast-acting toxins in a highly ciguatoxic barracuda (*Sphyrnaea barracuda*) by HPLC/MS and radiolabelled ligand binding. *Toxicon*, 2003, *42*, 663-672.
- Shimojo R. Y. & Iwaoka W. T., A rapid hemolysis assay for the detection of sodium channel-specific marine toxins. *Toxicol.*, 2000, *154*, 1-7.
- Swift A. E. B. & Swift T. R., Ciguatera. *J. Toxicol. - Clin. Toxicol.*, 1993, *31*, 1-29.
- Van Dolah F. M., Microplate receptor assays: laboratory procedures for analysis of marine biotoxins. In: Baden D. G., *Proceedings of the Workshop Conference on Seafood Intoxications: Pan American Implications of Natural Toxins in Seafood*, May 29-June 1 1995, University of Miami, Miami, The United States of America, 1996, pp. 50-56.
- Vernoux J.-P., The mouse ciguatoxin bioassay: directions for use to control fish for consumption. *Mem. Queensl. Mus.*, 1994, *34*, 625-630.
- Vernoux J.-P. & Lahlou N., Contrôle biologique de la ciguatoxine chez le poussin : analyse des symptômes induits et de la toxicité d'extraits de poissons ciguatoxiques de l'île de Saint-Barthélémy. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 1986, *79*, 140-146.
- Yasumoto T. & Scheuer P. J., Marine toxins of the Pacific VIII. Ciguatoxin from moray eel livers. *Toxicon*, 1969, *7*, 273-276.
- Yu F. H. & Catterall W. A., Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol.*, 2003, *4*, 207.1-207.7.