

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Ecole doctorale :
Diversité du Vivant
Spécialité : Ecotoxicologie

Présentée par
Anne-Sophie KERBRAT

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

***Rôle des cyanobactéries
dans le développement des zones ciguatérigènes
en lien avec les impacts anthropiques,
pour une meilleure gestion du risque ciguatérique.***

Soutenue le 07/10/2010, à Papeete, Tahiti, PF

Devant le jury composé de :

M. Marcel LE PENNEC	Président
M. Loïc CHARPY	Rapporteur
M. Serge PAUILLAC	Rapporteur
M. Jean-Michel N'GUYEN	Examinateur
M. Vincent MARECHAL	Examinateur
M. Stjepko GOLUBIC	Examinateur
M. Dominique LAURENT	Directeur de thèse
Mme Mireille CHINAIN	Directrice de thèse

Remerciements

*Mes premiers remerciements vont à **Dominique LAURENT**, mon directeur de thèse qui m'a donné l'opportunité de faire ce que j'aime. Merci de m'avoir offert la possibilité de travailler sur un sujet réellement passionnant, de m'avoir donné les moyens de le faire et de m'avoir soutenu (formations, colloques). Malgré l'éloignement, tu as su être présent jusqu'au bout. Merci !*

*Merci à **Mireille CHINAIN**, ma co-directrice, pour m'avoir aidé tout au long de ma thèse à travers les réflexions, la précieuse aide apportée pour les communications et jusqu'à la rédaction du manuscrit. Merci également pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire des Micro-algues toxiques à l'ILM, l'un des cœurs de la recherche ciguatérique.*

Merci à Fabrice Colin (ancien responsable de centre IRD de Nouméa) pour m'avoir accueillie à l'Institut. Je remercie l'Association nationale de la recherche et de la technologie (ANRT) et Vale pour l'attribution de la bourse CIFRE.

*Je remercie le président du jury **Marcel Le Pennec** et les membres du jury, je souhaiterais remercier en particulier **Serge Pauillac** et **Loïc Charpy** pour l'honneur qu'ils me font d'avoir acceptés d'être rapporteurs de cette thèse. Serge, merci pour l'aide apportée en tant que responsable du laboratoire des Biotoxines Marines de l'IPNC. Merci, à Loïc pour avoir suivi de loin mon travail notamment en tant que membre de mon comité de thèse. Merci, à Stjepko Golubic de me faire l'honneur d'examiner mon travail et d'avoir toujours été disponible pour me faire découvrir le monde des cyanobactéries et j'ajoute mes sincères remerciements pour son aide précieuse à l'identification morphotaxonomique. Je remercie Vincent Maréchal pour avoir accepté d'examiner mon travail en tant que Professeur de l'UPMC. Enfin, merci à Jean-Michel N'Guyen, pour faire partie du jury de thèse mais également pour avoir soutenu ce projet : en début, pour l'obtention de la bourse, puis tout au long afin de faciliter le travail de terrain et de communication.*

Je remercie Nathalie Simon, membre de mon comité de thèse, pour son intérêt pour le sujet et ses conseils.

Je tiens à remercier vivement Taiana H. Darius qui a effectué les analyses du test RBA et qui m'a fait part de son expérience des tests de toxicité. Merci à André Ung et Moté Tchou Fouc pour leur accueil lors de mon stage. Merci à Nicole Tandeau de Marsac (ancienne responsable de l'Unité des Cyanobactéries à l'Institut Pasteur de Paris) pour m'avoir accueillie dans son équipe et pour ses conseils en tant que membre de mon comité de thèse. Merci à Muriel Gugger pour m'avoir encadrée durant ce stage et initiée aux techniques de culture ; merci aux autres membres de l'équipe, notamment Jean-François Humbert et Rosemarie Rippka. Merci à Robert le Borgne pour m'avoir aidée et apportée ses connaissances sur les passionnantes Trichodesmium.

Milles Mercis à la population de la tribu de Hunëtë à Lifou qui nous ont ouvert les portes de leur jardin aquatique, sans quoi notre étude n'aurait pu avoir lieu. Je remercie en particulier Basie Ijeze, le petit chef de la tribu et Marianna, sa femme, ainsi que Martial, le chef des pêcheurs et Adèle, Oleti !

Merci à la population d'Ouvéa qui nous a accueillis durant notre étude et à la Province des îles pour le financement de cette étude et plus particulièrement à Ty Jonnesy pour l'organisation de ces missions, à Alibi pour sa collaboration et à tous les pêcheurs du Sud et du Nord (Famille Wéa).

Je remercie sincèrement Alain Videault pour son aide sur le terrain, au laboratoire et en tant que « chef » dans mes derniers mois au sein de l'UMR 152. Merci également à Antoine Holué, le jeune retraité de Hunëtë. Merci à John Butscher, le fameux pêcheur et à Guy Cabioch. Merci à Gérard Moutham, pour son expertise d'ichtyologie et enfin merci à Fanny Rossi qui m'a aidé dans les dernières manips lors de ma rédaction, bon courage pour la suite !!

Je remercie également le service environnement de Vale NC pour le support logistique durant les campagnes annuelles notamment Tatiana Stepanoff, Céline Casalis, Yannick Falelavaki, Yann Vessiller.

Merci à Cyrille Goarant de l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie et sa directrice, Suzanne Chanteau pour m'avoir permis de travailler sur le test souris.

Je remercie également les étudiants que nous avons accueillis dans l'UMR 152 et qui m'ont grandement aidé dans les longues manips d'extraction au laboratoire, mais aussi sur le terrain : Vincent Arnold, Magalie Desseigne, Magaly Téjada, Carole Deledicque et Antoine Simond. Je remercie les nombreuses personnes de l'IRD qui ont contribué de différentes manières à ce travail, je ne peux toutes les citer (personnels administratifs, de la documentation, techniques et les marins) et bien sûr les collègues de la plate-forme des substances naturelles. Egalement merci à toutes les personnes qui contribuent, à l'IRD, à un cadre de travail stimulant et à la fois agréable : VCATs et doctorants (Alex, Marie, Haizea, Elodie, Adeline, Ambre, Céline, Bastien, Maude, Fanny, Nico, Marion, Laure, Kiki et avec une pensée pour Nico P.) et à la bande de chimie & co.

Je remercie Maryvonne Frostin qui a fortement contribué à ma venue sur le caillou où tout un bout de vie s'y dessine. Merci aux filles, Mariko Matsui et Shilpa Kumar-Roiné sans qui l'aventure ciguatérique n'aurait vraiment pas été la même ! Merci à tous mes amis de Nouvelle-Calédonie, de Bretagne et d'ailleurs !

Enfin, merci à ma famille qui a vécu mes années ciguatériques de loin, merci à mes parents qui m'ont toujours donné la possibilité de continuer au-delà de mes envies. Je pense également bien fort à ceux qui sont partis trop tôt sans attendre mon retour !! Et enfin, merci à mon Nico qui m'accompagne depuis le début : c'est bon, la thèse est finie !!!

Rôle des cyanobactéries dans le développement des zones ciguatérigènes en lien avec les impacts anthropiques, pour une meilleure gestion du risque ciguatérique – résumé court

La ciguatéra est une intoxication consécutive à l'ingestion de poissons porteurs de ciguatoxines. Classiquement liée à la prolifération des dinoflagellés ciguatérigènes, elle est favorisée par les perturbations naturelles ou anthropiques des écosystèmes coralliens. Or récemment, certaines cyanobactéries marines du groupe des *Oscillatoriaceae* (*Hydrocoleum sp.*) ont également été impliquées dans des intoxications de type ciguatéra. Dans ce contexte, l'objectif général de cette thèse est de mieux comprendre le déterminisme ciguatérique afin de mieux le prévenir.

L'étude a constitué en un suivi écotoxicologique périodique de trois sites en Nouvelle-Calédonie : l'île de Lifou, réputée toxique ; la baie de Prony, en cours d'anthropisation ; l'atoll d'Ouvéa, réputé non ciguatérique, en ciblant spécifiquement l'étude de la diversité microbienne, l'évaluation de la toxicité à différents niveaux de la chaîne trophique (cyanobactéries, bénitiers, poissons) et la caractérisation des métabolites toxiques impliqués.

Ce suivi environnemental a mis en évidence un complexe toxinique *CTXs-like/cyanotoxines* chez les Oscillatoriaceae dominant les écosystèmes dégradés, ainsi que les poissons et bénitiers inféodés à ces zones. Parmi les cyanotoxines détectées *in situ*, citons l'homoanatoxine-a (neurotoxine paralysante) présente à la fois chez *Hydrocoleum lyngbyaceum* et les bénitiers *Tridacna maxima*, et la palytoxine, révélée pour la première fois chez *Trichodesmium erythraeum*.

Ces résultats originaux posent les bases d'un outil de surveillance sanitaire et écologique opérationnel d'un risque sanitaire en zone tropicale plus complexe que la ciguatéra telle qu'elle est connue actuellement.

Ciguatera / Cyanobactérie / Bénitier / Déterminisme / Ciguatoxine / Cyanotoxine

Involvement of cyanobacteria in the ciguatera phenomenon in relation to anthropogenic pressures, for a better monitoring– short abstract

Ciguatera, the most common marine intoxication, is caused by the consumption of coral reef fish which accumulate toxins through their diet. This ecotoxicological phenomenon is induced by natural and/or man-made disturbances of coral reefs ecosystems. With more substrate surface area available, the conditions are favorable for the proliferation of naturally occurring toxinogenic dinoflagellates known to produce ciguatoxins (CTXs). More recently, cyanobacteria of the order Oscillatoriaceae were also incriminated as potential progenitors of CTXs-like compounds. It is in this context that the present study was undertaken.

To understand better and to define management approaches that the involvement of these cyanobacteria poses to the risks of ciguatera outbreaks, surveys in New Caledonia were undertaken at three representative sites. These include: (i) Lifou Island where strong ciguatera intoxications incidence have been recorded; (ii) the Bay of Prony, which is close to the site of a mineral mining plant in construction; and (iii) the lagoon of Ouvéa that is reputed to be free of ciguatera. Studies on microorganisms (cyanobacteria and dinoflagellate) diversity, toxicological analyses of different trophic levels (cyanobacteria, fish and giant clams) and detection of toxic compounds were undertaken.

These ecotoxicological studies highlight the presence of a toxic matrix of CTXs-like compounds and cyanotoxins in Oscillatoriaceae cyanobacteria, in fish and giant clams collected in damaged areas where. For the first time, we are reporting the presence of homoanatoxin-a (a paralyzing neurotoxin), detected both in the cyanobacteria *Hydrocoleum lyngbyaceum* and the giant clam *Tridacna maxima*, and palytoxin and one of its derivative, 42-OH palytoxin detected in cyanobacteria samples of *Trichodesmium*.

Our findings emphasize the need of including the monitoring of marine cyanobacteria in management programs of ciguatera and also provide a new trophic link to the current ciguatera fish food chain. Consequently, we have named this new phenomenon as **Ciguatera Seafood poisoning**.

Ciguatera / Cyanobacteria / Giant clam / Ciguatoxin / Cyanotoxin / Ciguatera Seafood Poisoning

SOMMAIRE

Listes des annexes	5
Listes des abréviations	6
Listes des illustrations	9
Préambule	23
Chapitre 1 : Intoxications alimentaires provoquées par les organismes marins	24
I. Intoxications autres que la ciguatéra	24
I.1 Intoxications par les mollusques (invertébrés)	24
I.1.a Intoxication amnésique par les fruits de mer - IAFM ou ASP	24
I.1.b Intoxication diarrhéique par les fruits de mer - IDFIM ou DSP	25
I.1.c Intoxication neurologique par les fruits de mer - INFM ou NSP	25
I.1.d Intoxication paralysante par les fruits de mer - IPFM ou PSP	26
I.2 Intoxications par les vertébrés	28
I.2.a Le scombrotoxisme ou intoxication histaminique	28
I.2.b Le tétrodoxisme	29
I.2.c Le clupéotoxisme	29
I.2.d Le carchatoxisme	29
I.2.e Le chélonitoxisme	30
I.2.f Autres types d'intoxication moins fréquente	31
I.3 A chaque phycotoxine, son syndrome ?	31
II. La ciguatéra	33
II.1 Généralités	33
II.2 Historique	33
II.2.a Quelques repères	33
II.2.b Les étapes clés dans l'avancée des recherches	35
II.3 Aspects épidémiologiques.....	37
II.3.a Zone d'endémie	37
II.3.b Incidence	38
II.3.c Syndrome polymorphe	39
II.3.d Comment soigner la ciguatéra ?	42
II.4 Aspects socio-économiques	43
II.4.a Impact sur la santé publique et coût	43
II.4.b Impact sur l'économie	44
II.4.c Evaluation de l'impact économique global des biotoxines marines	44
II.5 Aspects toxicologiques - Les toxines associées au phénomène ciguatérique	44
II.5.a Les ciguatoxines	45
II.5.b Les maitotoxines	50
II.5.c Les acides gambiériques et le gambiérol	51
II.5.d L'acide okadaïque	51
II.5.e La palytoxine	52
II.6 Détection des organismes toxiques	53
II.6.a Tests traditionnels	53

II.6.b	Tests de laboratoire	54
II.6.c	Critères de choix d'un test	59
II.7 Aspects écologiques : l'étiologie du phénomène		61
II.7.a	Organismes ciguatoxinogènes	61
II.7.b	Organismes marins incriminés	67
II.7.c	Chaîne de transfert	68
II.7.d	Déterminisme du phénomène	70
Problématique et objectifs de thèse		74
I.	Contexte de travail	74
II.	Objectifs de l'étude	75
Chapitre 2 : Implication des cyanobactéries dans le phénomène écotoxicologique de la ciguatera et leur lien avec la toxicité des bénitiers		77
I.	Introduction	79
I.1	Les cyanobactéries marines toxiques.....	79
I.1.a	Généralités	79
I.1.b	Les cyanobactéries toxiques marines	80
I.1.c	Les facteurs de prolifération - stratégie de résistance	83
I.1.d	Les cyanotoxines	84
I.2	Les intoxications dues aux cyanobactéries	91
I.2.a	Tableaux cliniques	91
I.2.b	Incidence et nature des intoxications	93
I.3	La chaîne trophique et les vecteurs de toxicité	94
I.3.a	Le zooplancton	94
I.3.b	Les poissons	94
I.3.c	Les bénitiers	95
II.	Etudes écotoxicologiques de Hunëtë à Lifou	96
II.1	Introduction.....	96
II.1.a	Alerte sanitaire - Bilan épidémiologique	96
II.1.b	Zonation	97
II.1.c	Suivi écotoxicologique	97
II.2	Matériels et méthodes	99
II.2.a	Site d'étude	99
II.2.b	Prélèvements biologiques et périodicité du suivi	101
II.2.c	Extraction et purification	107
II.2.d	Dosage de la toxicité	113
II.3	Résultats	124
II.3.a	Données épidémiologiques	125
II.3.b	Données écologiques : évolution spatio-temporelle	125
II.3.c	Données toxicologiques	141
II.3.d	Identification des toxines	180
II.3.e	Synthèse : évolution de la toxicité sur le site d'étude de Hunëtë	181
II.4	Discussion	185

II.4.a	Caractérisation de la toxicité	185
II.4.b	Environnement	189
II.4.c	Comparaison avec les sites d'études du Vanuatu et de Raivavae	193
II.4.d	Etablissement d'un nouveau schéma de transmission	197
II.5	Conclusion	199
III.	Etude de la toxicité de <i>Trichodesmium</i> sp.	200
III.1	Introduction.....	200
III.1.a	<i>Trichodesmium</i> : une Oscillatoiale pélagique	200
III.1.b	Mise en évidence de la toxicité	201
III.2	Matériels et méthodes.....	202
III.2.a	Site d'étude et méthode de collecte	202
III.2.b	Extraction et analyses toxicologiques	203
III.2.c	Analyses chromatographiques des extraits hydrosolubles	203
III.3	Résultats	204
III.3.a	Récolte et Identification morphologique	204
III.3.b	Test souris.....	206
III.3.c	Résultats des tests N2A et RBA	207
III.3.d	Analyses LC-MS/MS	210
III.4	Discussion.....	213
III.4.a	Complexe toxinique de <i>Trichodesmium</i>	213
III.4.b	Caractérisation de la PTX	214
III.4.c	Impact sur l'environnement par voie bioaccumulative	215
III.4.d	Impact direct sur l'environnement	217
III.5	Conclusions.....	217
IV.	Conclusions du chapitre 2	218
<i>Chapitre 3 : La ciguatéra et les facteurs environnementaux : Etudes à Ouvéa et en baie de Prony</i>		219
I.	Introduction	219
I.1	Contexte	220
I.1.a	La ciguatéra et son déterminisme	220
I.1.b	Ouvéa : atoll réputé indemne de ciguatéra	224
I.1.c	La baie de Prony	225
I.2	Bilan et synthèse du contexte	232
I.3	Objectifs	234
II.	Matériels et méthodes	234
II.1	Plan de suivi : zonation et fréquence	234
II.1.a	Site d'Ouvéa	234
II.1.b	Micro-organismes et poissons	235
II.1.c	La baie de Prony	236
II.2	Echantillonnage et analyse des prélevements	239
II.2.a	Micro-organismes	239

II.2.b	Poissons _____	240
III.	Résultats _____	244
III.1	Site d'Ouvéa	244
III.1.a	Micro-organismes _____	244
III.1.b	Poissons _____	248
III.2	Site de Prony	254
III.2.a	Paramètres physico-chimiques _____	254
III.2.b	Micro-organismes _____	256
III.2.c	Poissons _____	263
IV.	Discussion _____	273
IV.1	Avant propos : la méthode de suivi	273
IV.2	Micro-organismes, à la base de la toxicité.....	275
IV.3	Toxicité des poissons, vecteurs de toxicité	277
IV.4	Facteurs ciguatoxinogènes.....	278
IV.5	Evaluation du risque	279
V.	Conclusions et perspectives _____	279
Conclusions _____		280
Références bibliographiques _____		282

LISTES DES ANNEXES

Annexe 1 : Courbes de cytotoxicité obtenues à l'aide des fractions F1, F2 et F3 des extraits liposolubles des mattes purifiées sur sep-pak® de cyanobactéries récoltées au niveau de la ZT de Hunëtë à Lifou.....	301
Annexe 2 : Courbes de cytotoxicité obtenues à l'aide du test N2A des fractions F1, F2 et F3 des extraits liposolubles des mattes purifiées sur sep-pak® de <i>Trichodesmium</i> (échantillons n°1 à 9).....	302
Annexe 3 : Alignements des séquences nucléotiques de la région ITS amplifiée par PCR (460 pb) des aliquots de mattes de cyanobactéries dominées par <i>H. lyngbyaceum</i> de Lifou (avril 2005, L2) et des cyanobactéries de référence, du genre <i>Trichodesmium</i> (Z9 et IMS 101), <i>Oscillatoria</i> (PCC 7515) et <i>Phormidium</i> (OL05_phorm) (Méjean <i>et al.</i> , 2009).	303
Annexe 4 : Récolte des micro-organismes en septembre 2007 et mai 2008 à Ouvéa.....	304
Annexe 5 : Récolte des poissons de septembre 2007 à Ouvéa et données de toxicité.	308
Annexe 6 : Paramètres du suivi biosystémique mené en 2008 et 2009 par Vale dans le cadre de son suivi environnemental.	312
Annexe 7 : Récolte des poissons d'avril 2008 et 2009 à Prony et données de toxicité.....	313
Annexe 8 : Diffusion de l'information scientifique	318

Listes

des abréviations et

des illustrations

LISTES DES ABBREVIATIONS

[³H]PbTx-3 :	Brévétoxine tritiée (marquée)
AD :	Acide domoïque
ARNr :	Acide ribonucléique ribosomique
AFSSA :	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
AFSSET :	Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail
ANRT :	Asociation Nationale de la Recherche et de la Technologie
AnTX-a(s) :	Anatoxine-a(s)
AnTX-a :	Anatoxine-a
AO :	Acide okadaique
AOAC :	<i>Association of Analytical Communities</i>
ASP :	<i>Amnesic Shellfish Poisoning</i>
BSA :	<i>Bovine Serum Albumine</i>
C₆H₁₂ :	Cyclohexane
Ca²⁺ :	Ion calcium
CaCl₂ :	Chlorure de calcium
CDC :	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
Cf. :	<i>confer</i>
CH₂Cl₂ :	Dichlorométhane
Ci :	Curie, unité de radioactivité
Cl₅₀:	Concentration inhibant 50% de l'activité recherchée
CPS :	Secrétariat de la Communauté du Pacifique
CSSP :	Canal sodium sensible au potentiel
CTX(s) :	Ciguatoxine(s)
Da :	Dalton
DALYs :	<i>Disability-Adjusted Life Years</i>
DL₅₀:	Dose létale pour 50% d'un lot de souris
DMSO :	Diméthyl sulfoxyde
DO :	Densité optique
DSP :	<i>Diarrheic Shellfish Poisoning</i>
DST(s) :	<i>Diarrehic Shellfish Toxin(s)</i>
DTX(s) :	Dinophysistoxine(s)
EDTA :	Acide éthylène tétra-acétique
ELISA :	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
Eqv :	Equivalent
et al. :	<i>et alii</i> (abrégé latine : et collaborateurs)
FAO :	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FAT(s) :	<i>Fasts-Acting Toxin(s)</i>
GC-MS :	Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
GTX(s) :	Gonyautoxine(s)
GTx(s) :	Gambiertoxines
H₂O :	Eau
HAB :	<i>Harmful Algal Bloom</i>

HAnTX-a :	Homoanatoxine-a
HEPES :	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HPLC :	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Chromatographie en phase liquide à haute performance)
i.n. :	Intra-nasal
i.p. :	Intra-péritonéal
i.v. :	Intra-veineux
IAFM :	Intoxication Amnésiant par Fruits de Mer
IDFM :	Intoxication Diarrhéique par Fruits de Mer
IFREMER :	Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer
ILM :	Institut Louis Malardé
IPFM :	Intoxication Paralysante par Fruits de Mer
IRD :	Institut de Recherche pour le Développement
ITS :	<i>Internal Transcribed Spacer</i> (Région intergénique transcrise)
K⁺ :	Ion potassium
KCl :	Chlorure de potassium
LERQAP :	Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur la Qualité des Aliments et les Procédés agro-alimentaires
MeOH :	Méthanol
Mg²⁺ :	Ion magnésium
MgSO₄ :	Sulfate de magnésium
ML :	Matière lyophilisée
MS :	Matière sèche
MTT :	Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
MTX(s) :	Maitotoxine(s)
Na⁺/K⁺-ATP-ase :	Pompe transmembranaire Na ⁺ -K ⁺
Na⁺ :	Ion sodium
NADPH :	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
ND :	Non déterminé
NO :	Oxyde nitrique
O :	Ouabaïne
OMS :	Organisme mondial de la santé
pb :	Paire de bases
PBS :	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PbTx(s) :	Brévétoxines
PCR :	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PKs :	PolyKétide Synthases
ppb :	Partie par billion (1 : 10 ⁹)
ppt :	Partie par trillion (1 : 10 ¹²)
PSP :	<i>Paralytic Shellfish Poisoning</i>
PTX(s) :	Palytoxine(s)
Réf. :	Référence
Réphy :	Réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines
RMN :	Résonance magnétique nucléaire
Rpm :	Rotation par minute

RPMI :	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (milieu de culture)
SPE :	Extraction en phase solide
STX(s) :	Saxitoxine(s)
SVF :	Sérum de Veau Fœtal
Test N2A :	Test de cytotoxicité sur neuroblastomes (Neuro-2A)
Test RBA :	Test <i>Receptor Binding Assay</i> , test de fixation spécifique sur synaptosomes de rat
TTX :	Tétrodotoxine
V :	Vératridine
Vale NC :	Vale Nouvelle-Calédonie
ZNT :	Zone non toxique
ZT :	Zone toxique

LISTES DES ILLUSTRATIONS***Figures***

Figure 1 : Familles de toxines d'algues marines: (A) saxitoxine, (B) brévétoxine, (C) ciguatoxine, (D) acide okadaïque, (E) acide domoïque. (D'après Van Dolah, 2000).	27
Figure 2 : Distribution des intoxications alimentaires par fruits de mer (d'après Frémy et Lassus, 2001 et Van Dolah, 2000).....	28
Figure 3 : (a) structure de l'histamine, responsable du scombrotoxisme, (b) structure de la tétridotoxine, responsable du térodotoxisme, (c) structure de la palytoxine, toxine fortement suspectée d'être responsable du clupéotoxisme et (d) structure de la lyngbyatoxine, impliquée dans le chélonitoxisme.....	30
Figure 4 : Zones touchées par les intoxications ciguatériques.	37
Figure 5 : Nombre de cas d'intoxication ciguatérique déclarés en Nouvelle-Calédonie de 1984 à 2008 (Données DPASS, 2009).	39
Figure 6: Evolution des symptômes au cours des trois premiers jours d'intoxication ciguatérique (d'après Lawrence <i>et al.</i> , 1980).	40
Figure 7 : Classement par ordre décroissant (Fréquence, %) des symptômes observés sur 3009 cas d'intoxications ciguatériques ; les symptômes sont classés en quatre groupes : neurologiques (bleu), gastro-intestinaux (rose), cardio-vasculaires (blanc) et généraux (noir) (Données de Bagnis, 1979).	40
Figure 8: Structure chimique de quelques CTXs (Extrait de Lewis, 2006).	46
Figure 9: Diversité de profils toxiniques dans la chaîne trophique (Source ILM, données non publiées).	46
Figure 10: Modèle structural simplifié du canal sodium sensible au potentiel (CSSP).	47
Figure 11: Structure de la MTX-1.	50
Figure 12 : Structure chimique des acides gambiéiques (Morohashiet <i>al.</i> , 2000) et du gambiérol (Ito <i>et al.</i> , 2003).	51
Figure 13 : Courbes de régression sigmoidale de la C-CTX-1 obtenues par le test N2A (o) et le test RBA (●) (extrait de Bottein-Dechraoui <i>et al.</i> , 2005).	58

Figure 14 : Cellule de <i>Gambierdiscus</i> : (a) schéma de la vue ventrale (extrait de Adachi and Fukuyo, 1979), (b) vue latérale en microscopie optique (source ILM) et (c) vue ventrale en microscopie électronique à balayage (source IRD).	62
Figure 15 : Vues hypothècales des dix espèces de <i>Gambierdiscus</i> décrites, barre d'échelle = 50 µm (extrait de Litaker <i>et al.</i> , 2009).	63
Figure 16: Biogenèse de la ciguatéra.	69
Figure 17 : Diversité de formes parmi les genres de cyanobactéries toxiques les plus fréquemment rencontrés (D'après Lawton L. <i>et al.</i> , 1999).....	81
Figure 18 : Structures des microcystines (a), des nodularines (b), et de la cylindrospermopsine(c) (Extrait de Welker, 2008).....	86
Figure 19 : Structure des neurotoxines (extrait d'Aráoz, 2009).....	89
Figure 20 : Carte de la zone de pêche des habitants de la tribu de Hunëtë et nombre de cas d'intoxications par zone selon l'étude épidémiologique.	97
Figure 21 : Situation de la Nouvelle-Calédonie et de Lifou.....	99
Figure 22 : Vue aérienne de la zone de pêche de la tribu de Hunëtë à Lifou, zonation des prélèvements : 6 transects de A à B, perpendiculaires à la côte et 3 transects de 1 à 3 parallèles à la côte définissant 18 points de prélèvements.	101
Figure 23: Protocole de prélèvement des microorganismes : prélèvement manuel en plongée libre, extraction des cellules épiphytes par agitation, filtration et récupération des microorganismes, observation des échantillons au microscope optique.....	103
Figure 24 : Espèces de bénitiers rencontrées sur le site d'étude : a) <i>Tridacna squamosa</i> , b) <i>Tridacna maxima</i> et c) <i>Hippopus hippopus</i>	106
Figure 25: Protocole d'extraction des bénitiers et des cyanobactéries (d'après Mc Elhiney <i>et al.</i> , 1998 ; Nicholson and Bruch, 2001 ; Laurent <i>et al.</i> , 2008) ; Extrait liposoluble (1) des cyanobactéries et extrait liposoluble (1)* délipidé des bénitiers.....	108
Figure 26: Étapes de l'extraction rapide en phase solide.	110
Figure 27 : Structures chimiques de la vératridine (a) et de l'ouabaïne (b).	119
Figure 28 : Schéma de plaque pour le test de cytotoxicité.....	120
Figure 29 : Test RBA, (a) Principe du test RBA basé sur la compétition entre un radioligand et un composé d'affinité différente pour un même récepteur ; (b) Courbe de compétition permettant de calculer la concentration d'inhibition à 50% (CI ₅₀) (D'après Dechraoui-Bottein, 1999).....	122

Figure 30 : Evolution annuelle (12/2008 à 12/2009) des températures moyennes quotidiennes de l'eau en ZT (5A) (sonde immergée à 1 m de profondeur environ).	126
Figure 31: Diversité générique des Oscillatoires présentes en ZT (données pour août, novembre 2007 et février 2009 non disponibles).	137
Figure 32 : Absorbance (DO) à 490 nm en fonction du nombre de cellules ensemencées : La DO est proportionnelle au nombre de cellules jusqu'à 50 000 cellules par puits ($R^2 = 0,9181$).	147
Figure 33 : Effets du méthanol sur la viabilité cellulaire des neuroblastomes.	147
Figure 34 : Effets cytotoxiques de la PbTx-3 en conditions (+OV) et (-OV) (n = 3). Présentation de deux essais indépendants (ex.1 et ex.2).	148
Figure 35 : Evaluation des effets cytotoxiques d'extraits liposolubles de cyanobactéries +OV, (a) courbes de cytotoxicité, (b) valeurs des Cl_{50} en $\mu\text{g} / \text{mL}$	149
Figure 36 : Effets cytotoxiques des fractions F1, F2, F3 d'extraits liposolubles de cyanobactéries purifiés sur Sep-pak®	152
Figure 37 : Valeurs des Cl_{50} des fractions F2 des extraits liposolubles des cyanobactéries purifiées sur sep-pak ($\mu\text{g équivalent} / \text{mL}$) ; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$	154
Figure 38 : Courbes de compétition du test RBA des extraits d' <i>H. lyngbyaceum</i> (avril 2005, L2) obtenus selon différents protocoles d'extraction : (a) protocole A (extrait n°1), (b) protocole B (extraits n°2, 3 et 4), (c) protocole C (extraits n°5 et 6).	158
Figure 39 : Courbes de compétition des extraits liposolubles de cyanobactéries récoltées en ZT à Lifou.....	159
Figure 40 : Données d'extraction et des deux purifications (Hamilton <i>et al.</i> , 2002) effectuées sur le lots de bénitiers récoltés en novembre 2005 (L3) dans la ZT de Hunëtë.	164
Figure 41 : Effets cytotoxiques des extraits liposolubles des lots de bénitiers « témoin » B (2008) et collectés à Lifou en ZT en février 2007 (L9).	168
Figure 42 : Valeurs des Cl_{50} (en mg eqv de chair lyophilisée ou fraîche) des extraits de bénitiers récoltés en février 2008, issus de l'extraction rapide (F2) ou de l'extraction liquide / liquide (extrait liposoluble 1).	170
Figure 43 : Valeurs des Cl_{50} (en $\mu\text{g} / \text{mL}$) des extraits liposolubles de bénitiers récoltés en février 2008 (L12) et 2009 (L15) ; les barres pointillées représentent les valeurs Cl_{50} de bénitiers collectés en ZNT.....	171

Figure 44 : Effets cytotoxiques des extraits de bénitiers collectés à Lifou en ZT en novembre 2005 (L3) ; E1 : extrait liposoluble (1), E1F4 et E1F5 : fractions obtenues par purification sur colonne de Florisil® , E2F2 : étape 2 de purification sur colonne de Sephadex® LH20.	172
Figure 45 : Effets cytotoxiques des extraits liposolubles de lot de bénitiers « témoin » A (2006) ; E1 : extrait liposoluble (1), E1F5 et E1F6 : fractions obtenues par purification sur colonne Florisil®.	172
Figure 46 : Courbes de compétition du test RBA des extraits (mg / mL) de bénitiers de Lifou collectés en novembre 2005 (L3).....	173
Figure 47 : Effets cytotoxiques en conditons (+OV) des extraits (en mg eqv / mL) de chair de perroquets collectés dans la zone de pêche de Hunëtë en 2007, 2008 et 2009. .	177
Figure 48 : Effets cytotoxiques des extraits (en mg eqv / mL) de saumonée (S), de chair (M chair) et de foie (M foie) de murène collectés dans la ZT en 2007 (L9).	179
Figure 49: Structure des turbotoxines-A et -B extraites des viscères du gastéropode <i>Turbo marmorata</i> (Kighoshi <i>et al.</i> , 2000).....	188
Figure 50: Localisation et vue de l'île d'Emao, Vanuatu.	194
Figure 51: Proposition d'une nouvelle voie de bioaccumulation des biotoxines de la chaîne trophique de la ciguatéra impliquant les cyanobactéries et les bénitiers, ou « <i>Ciguatera Shellfish Poisoning</i> ».....	198
Figure 52 : Courbes de compétition obtenues au moyen du test RBA sur les extraits liposolubles de <i>Trichodesmium</i>	209
Figure 53 : Mise en évidence par analyse LC-MS/MS de la présence de 42-OH-PTX (a) et PTX (b) dans les échantillons de <i>Trichodesmium erythraeum</i> . Chromatogramme des standards de 42-OH-PTX (c), et PTX (d) (Wako).	212
Figure 54: Carte de la Nouvelle-Calédonie : situations d'Ouvéa et de l'implantation de l'usine de Vale NC dans le sud de la Grande Terre.	220
Figure 55 : Carte d'Ouvéa, délimitation de la zone inscrite au Patrimoine Mondial de l'Humanité.	225
Figure 56 : Carte de la zone du sud de la Grande Terre et de l'implantation des différentes infrastructures de Vale NC.....	227
Figure 57 : Les 5 Sites de pêche à Ouvéa pour l'étude menée en septembre 2007	235
Figure 58 : Carte marine de la baie de Prony et du Canal de la Havannah : sites d'observations des micro-organismes (points) et zones de pêche (Z1 à Z4).	237

Figure 59 : Schéma de plaque pour l'analyse de toxicité des poissons (Test N2A) : exemple donné pour le test des poissons P1 et P2 à 3 concentrations (a, b et c ; n = 3) avec et sans OV (+OV et -OV) ; les témoins sont les cellules seules (MS ; n = 9), les cellules seules en présence d'OV (OV ; n = 9) et les cellules en présence d'OV et de la PbTx-3 à 3 concentrations (PbTx-3 +OV ; n= 2)	242
Figure 60 : Courbes de cytotoxicité du test N2A des poissons « témoins » : a, poissons de régime herbivore et b, poissons de régime carnivore (n = 3).	243
Figure 61 : Points d'observations des micro-organismes à Ouvéa (08/2007 et 05/2008). ...	245
Figure 62 : Poissons pêchés à Ouvéa en septembre 2007 : nombre de spécimens par régime trophique et par site de collecte.	250
Figure 63 : Cytotoxicité des poissons collectés à Ouvéa en 2007 selon les noms vernaculaires classés par niveau trophique : herbivore, « divers » (zooplanctonophage, mangeur d'invertébrés benthiques, omnivore) et carnivore.	251
Figure 64 : Cytotoxicité des chairs de poissons en fonction du régime alimentaire et de la zone de pêche.....	252
Figure 65 : Nombre de poissons cytotoxiques par classe de taille (cm)	253
Figure 66 : Nombre de poissons cytotoxiques par classe de poids (kg)	254
Figure 67 : Valeurs des températures des stations de suivi des micro-organismes.....	255
Figure 68 : Relevés des abondances des cyanobactéries sur 5 sites en octobre 2008 et juin 2009 (données Vale NC, voir annexe pour les sites et le détail de la méthodologie).	261
Figure 69 : Courbes de cytotoxicité des fractions F1, F2 et F3 des extraits liposolubles de cyanobactéries récoltées en octobre 2009 en baie de Prony (site 4, P30).	262
Figure 70 : Nombre d'individus par espèces collectées en 2008 et 2009 réparties par zone.	264
Figure 71 : Espèces récoltées sur les zones du port de Prony, Bonne Anse et Port Boisé en 2008 et 2009.	264
Figure 72 : Nombre d'individus toxiques (Tox+ et Tox++) pêchés en 2008 et en 2009 selon leur zone (Port, Bonne Anse et Port Boisé) et leur régime alimentaire.....	271
Figure 73 : Nombre d'individus par classe de toxicité (Atox, Tox+ et Tox++) pêchés en 2008 et 2009 selon le régime alimentaire groupé par classe.....	272

Figure 74 : Nombre d'individus pêchés en 2008 et 2009 par classe de toxicité (Tox+ et Tox++) selon l'espèce et la zone de prélèvement.	273
Figure 75 : Localisation des stations du suivi mené par Vale (données Vale).	312

Tableaux

Tableau 1: Synthèse des informations sur les intoxications alimentaires par consommation de produits de la mer (d'après Château-Degat, 2003; Van Dolah, 2000 ; Frémy et Lassus, 2001).	32
Tableau 2 : Caractéristiques et potentiels toxiques de quelques CTXs (d'après Lehane and Lewis, 2000 ; Lewis, 2006 ; Dechraoui, 1999 ; Bottein-Dechraoui <i>et al.</i> , 2005) ...	49
Tableau 3 : Caractéristiques des tests <i>in vivo</i> utilisés dans la détection de la ciguatoxicité (d'après Boydron <i>et al.</i> , 2004) ; *US : unité souris (Legrand <i>et al.</i> , 1982)	56
Tableau 4 : Avantages et spécificités de quelques techniques d'analyses des phycotoxines (d'après Frémy et Lassus, 2001).....	60
Tableau 5 : Espèces de <i>Gambierdiscus</i> décrites (d'après Litaker <i>et al.</i> , 2009).	62
Tableau 6 : Espèces de cyanobactéries potentiellement toxiques et des toxines associées ayant déjà été observées en France (AFSSA et AFSSET, 2006).	85
Tableau 7 : Caractéristiques des principales cyanotoxines connues : nombre de congénères décrits, espèces sources et toxicité selon différents modes d'administration (i.v. : intra-veineux, i.p. : intra-péritonéal ; i.n. : intra-nasal) (d'après Codd, 2000 et Furey <i>et al.</i> , 2008 <i>in</i> Botana).	90
Tableau 8 : Espèces de poissons ayant provoqué des intoxications ciguatériques relevées par l'étude épidémiologique.	96
Tableau 9 : Caractéristiques des 18 points de prélèvements.	102
Tableau 10 : Synthèse des tests utilisés pour évaluer le potentiel toxinique des différentes matrices biologiques selon les modes d'extraction et de purification utilisés. ..	113
Tableau 11 : Critères utilisés pour classer les extraits testés en test souris par niveaux de toxicité (effet de l'injection i.p. de 1 mg d'extrait de cyanobactérie ou 5 mg d'extrait de bénitier par g de souris).....	115
Tableau 12 : Symptômes caractéristiques chez la souris après injection en i.p. des différentes cyanotoxines et phycotoxines (d'après Frémy et Lassus, 2001 ; Cronberg and Annadotter, 2006 ; Riobó <i>et al.</i> , 2008 ; Aráoz <i>et al.</i> , 2009).	115

Tableau 13 : Missions effectuées à Lifou de 2005 à 2010 : nom, date et nature de l'échantillonnage.....	124
Tableau 14 : Densités cellulaires de <i>Gambierdiscus</i> (cellules / mL) observées par transects de prélèvements pendant toute la période d'étude (mars 2005- avril 2010) (0 : absence de cellules de dinoflagellés)	128
Tableau 15 : Synthèse des espèces de cyanobactéries présentes à Hunëtë pendant toute la période d'étude (mars 2005 – avril 2010).....	136
Tableau 16 : Caractéristiques des échantillons de cyanobactéries analysés et masses d'extraits obtenues en extraction méthanolique et extraction méthanolique acide (Mc Elhiney <i>et al.</i> , 1998 ; Nicholson and Bruch, 2001 et Laurent <i>et al.</i> , 2008).....	142
Tableau 17 : Liste des extraits liposolubles (1) de cyanobactéries récoltées en ZT purifiés sur Sep-Pak®	143
Tableau 18 : Données de toxicité des extraits hydrosolubles (1) et (2) et liposolubles (1) et (2) de cyanobactéries analysés à l'aide du test souris : DL ₅₀ estimée en mg d'extrait / g de souris, Classe de toxicité et Symptômes principaux..	145
Tableau 19 : Valeurs des Cl ₅₀ des extraits liposolubles de cyanobactéries (µg / mL) et coefficients de Hill correspondants.....	149
Tableau 20 : Valeurs des Cl ₅₀ des fractions F2 des extraits liposolubles de cyanobactéries (µg eqv / mL).....	153
Tableau 21 : Comparaison des valeurs moyennes, minimum et maximum, des Cl ₅₀ en conditions +OV des extraits liposolubles (1) de cyanobactéries et des fractions F2 de ces mêmes extraits liposolubles préalablement purifiés sur sep-pak®	156
Tableau 22 : Valeurs moyennes, minimum (min.) et maximum (max.) des Cl ₅₀ des fractions F2 des extraits liposolubles de cyanobactéries obtenues par le test N2A (+OV) ; ces valeurs sont converties en eqv de toxines pures selon Dechraoui <i>et al.</i> , 1999..	157
Tableau 23 : Valeurs des Cl ₅₀ du test RBA pour les extraits d' <i>H. lyngbyaceum</i> (L2).....	158
Tableau 24 : Valeurs des Cl ₅₀ du test RBA pour les extraits liposolubles de cyanobactéries récoltées en novembre 2005 (L3), mars et août 2006 (L6 et L7).....	159
Tableau 25 : Valeurs des Cl ₅₀ du test RBA pour les fractions F2 purifiés sur Sep-pak® des extraits liposolubles de cyanobactéries récoltées de novembre 2005 à novembre 2009 (L3, L6, L7, L9, 12, L13, L14 et L17).....	160

Tableau 26 : Caractéristiques des lots de bénitiers récoltés à Lifou de 2005 à 2006 et bénitiers « témoins », masses d'extraits obtenues en extraction méthanolique et extraction méthanolique acide (Mc Elhiney <i>et al.</i> , 1998 ; Nicholson and Bruch, 2001 et Laurent <i>et al.</i> , 2008)	161
Tableau 27 : Bénitiers récoltés en 2008 et 2009, caractéristiques : masses d'extraits obtenues à l'issue des extractions méthanoliques et des extractions méthanoliques acides (Mc Elhiney <i>et al.</i> , 1998 ; Nicholson and Bruch, 2001 et Laurent <i>et al.</i> , 2008)...	162
Tableau 28 : Données des purifications sur colonne de Florisil® et de Sephadex LH20 des bénitiers pêchés à Lifou dans la ZT en novembre 2005 (L3) et du bénitier « témoin » récolté en 2006.	163
Tableau 29 : Masses (mg) des fractions purifiées de l'extrait liposoluble du bénitier « Témoin » (2006), collectées après purification sur colonne de Florisil® (Hamilton <i>et al.</i> , 2002).....	163
Tableau 30 : Données de toxicité des extraits hydrosolubles (1) et (2) et liposolubles (1) et (2) de bénitiers analysés à l'aide du test souris : DL ₅₀ estimée en mg d'extrait / g de souris, Classe de toxicité et principaux symptômes observés (ND : Non déterminée).....	166
Tableau 31 : Valeurs des Cl ₅₀ (en µg d'extrait / mL et g de chair fraîche / mL) des extraits liposolubles et cyclohexaniques du lot de bénitiers « témoin » B (08/2008) et du lot de bénitiers de la ZT pêchés en février 2007, L9, en conditions -OV et +OV. 169	
Tableau 32 : Toxicité exprimée en mg eqv de P-CTX-3C / g d'extrait des extraits et fractions analysés par le test RBA.	174
Tableau 33 : Caractéristiques et données d'extraction rapide des poissons récoltés en 2007, 2008 et 2009 à Lifou (ZT (rose), ZNT (bleu) ; MF : masse de chair fraîche.....	176
Tableau 34 : Valeurs des Cl ₅₀ en mg eqv de chair / mL et toxicité des poissons collectés dans la zone de pêche de Hunëtë en 2007, 2008 et 2009 (L9, L12 et L15).	178
Tableau 35 : Synthèse des toxicités mises en évidence à l'aide des tests souris, N2A et RBA, sur les échantillons de cyanobactéries, bénitiers et poissons collectés de 2005 à 2008 dans la zone de pêche dite toxique de Lifou : test N2A : Cl ₅₀ exprimée en µg eqv d'extrait / mL (ou µg d'extrait liposoluble / mL) et test RBA : toxicité exprimée en µg eqv. P-CTX-3C / g eqv d'extrait liposoluble (ou en µg eqv. P-CTX-3C / g d'extrait liposoluble	182
Tableau 36 : Valeurs de Cl ₅₀ des extraits liposolubles des cyanobactéries évaluées par le test N2A.....	184

Tableau 37 : Echantillons de <i>Trichodesmium</i> spp. : Numéro de référence (réf.), date, nom et site de collecte, identification de l'espèce majoritaire et rendement de l'extraction (extrait hydrosoluble et liposoluble) donné en % de matière lyophilisée (ML).	205
Tableau 38 : Données de toxicités des extraits hydrosolubles et liposolubles de <i>Trichodesmium</i> spp. analysés par le test souris : DL ₅₀ estimée en mg d'extrait / g de souris, Classe de toxicité et Symptômes principaux.	207
Tableau 39 : Toxicités des extraits liposolubles (1) de <i>Trichodesmium</i> évaluées par des tests N2A et RBA ; ND: valeur non déterminée.	208
Tableau 40 : Cytotoxicité des fractions F2 (MeOH : H ₂ O ; 90 : 10) d'extraits liposolubles (1) de <i>Trichodesmium</i> : valeurs des Cl ₅₀ (µg eqv d'extrait / mL) et coefficients de Hill.	210
Tableau 41 : Concentrations de PTX et son analogue en µg / g d'extrait hydrosoluble et en µg eqv de PTX / g de matériel lyophilisé dosées par analyses LC-MS/MS.....	211
Tableau 42 : Définition des 5 sites regroupant les zones de pêches à Ouvéa	235
Tableau 43 : Site d'observation des micro-organismes : référence, nom et coordonnées GPS et zones de pêche correspondantes, référence et nom.	237
Tableau 44 : Caractéristiques des poissons « témoins » utilisés et valeurs de toxicité obtenues à l'aide des tests souris et RBA réalisées à l'ILM.....	243
Tableau 45 : Valeurs de Cl ₅₀ des poissons « témoins » obtenus par le test N2A dans nos conditions expérimentales.	244
Tableau 46 : Classes de toxicité des poissons attribuées par le test N2A, par évaluation des valeurs de cytotoxicité provoquées par 313 µg eqv de chair / mL : Atoxique (Atox), moyennement toxique (Tox+) et fortement toxique (Tox++).....	244
Tableau 47 : Points de prélèvement de cyanobactéries observées sous forme de mattes (surface > 2 m ²).	245
Tableau 48 : Poissons pêchés à Ouvéa en septembre 2007 : nombre de spécimens par espèce et par site de collecte rangés par ordre croissant de niveau trophique.	249
Tableau 49 : Nombre d'individus par classe de toxicité évalué par le test N2A des poissons pêchés à Ouvéa en septembre 2007.....	250
Tableau 50 : Analyses physico-chimiques des stations du Port de Prony, de Port Boisé, de la Baie Nord et de l'îlot Casy effectuées en mars 2007 et août 2008.....	256
Tableau 51 : Données d'observations par sites des prélèvements de micro-organismes épiphytiques à Prony depuis 2007 : 0 : absence de cellules de dinoflagellés et	

nombre de cellules de <i>Gambierdiscus</i> spp. / g d'algues ; case vertes : présence de trichomes de cyanobactéries.	257
Tableau 52 : Nombre de poissons prélevés par zone en 2008 et 2009.	263
Tableau 53 : Espèces de poissons collectées au Port de Prony, à Bonne Anse, à Port Boisé et à l'îlot Gabriel en 2008 et 2009 : Régime alimentaire et indice trophique, nombre d'individus, moyenne de taille ± ET (en cm) et de poids ± ET (en g) par espèce.	268
Tableau 54 : Nombre d'individus toxiques (Tox+ et Tox++) ; en %) pêchés en 2008 et en 2009 par zone, en baie de Prony et à Port Boisé.	269
Tableau 55 : Nombre d'individus par classe de toxicité (Atox, Tox+ et Tox++) et par espèce pêchés en 2008 et en 2009 par zone, en Baie de Prony et à Port Boisé.....	269

Illustrations photographiques

Photo 1 : <i>Livona pica</i> , le turbo nommé <i>sigua</i> qui provoque des intoxications neuro-digestives à l'origine du nom ciguatéra.....	34
Photo 2: <i>Ctenochaetus striatus</i>	35
Photo 3 : <i>Gymnothorax javanicus</i> , l'extraction de son foie a permis l'élucidation structurale des premières CTXs.	36
Photos 4, 5, 6 : Plantes utilisées dans les remèdes traditionnels : faux-tabac (<i>Heliotropium foertherianum</i>), faux poivrier (<i>Schinus terebenthifolius</i>) et vitex (<i>Vitex trifolia</i>)..	42
Photos 7 et 8: (1) La baie Shark en Australie est un des très rares endroits du monde qui abritent encore des stromatolithes en développement actif. (2) Stromatolithe contemporain, en croissance, sur le littoral ouest de l'Australie, dans le parc national de Yalgorup.	79
Photos 9 et 10: Mattes de <i>Lyngbya majuscula</i> sur un tombant récifal (au premier plan) et en phase de récolte.	82
Photos 11 et 12 : Vues sous-marines de la zone située au pied de la mise à l'eau.....	98
Photos 13, 14, 15, 16 : Exemples de macroalgues-supports des dinoflagellés rencontrées sur le site d'étude de Hunêtë (13 : <i>Halimeda</i> , 14 : <i>Turbinaria</i> , 15 : <i>Dictyota</i> et 16 : <i>Lobophora</i>).	102
Photos 17, 18, 19 : Vues macroscopiques de diverses colonies de cyanobactéries filamenteuses benthiques et pélagiques.	105

Photo 20 : Récolte en plongée bouteille de cyanobactéries à l'aide d'un aspirateur sous-marin.....	105
Photo 21 : Conditionnement des cyanobactéries avant la lyophilisation, le relargage des pigments est visible à la vive coloration indigo.....	109
Photo 22 : Système de cuve à vide sur lequel sont fixés les filtres et les cartouches utilisés pour l'extraction rapide.....	111
Photo 23 : Vues au microscope des neuroblastomes de souris, Neuro-2A (source ATCC) ..	117
Photos 24, 25, 26 et 27 : Vues de la ZNT (24) et ZT (25) à marée haute (26) et à marée basse (27) de grande amplitude.....	126
Photos 28 et 29 : Etat de la rampe de mise à l'eau au niveau de la ZT, prises de vue en avril 2005 (28) et en février 2009 (29). ..	127
Photos 30 : Cellules de <i>Gambierdiscus</i> (a, *200) et filaments de cyanobactéries (b, *10 et c, *40) observées au microscope optique.	128
Photo 31 : Fraction 45 à 250 µm (a) de la zone 6A récoltée en novembre 2007 (L17) dans laquelle une efflorescence de diatomées est observée au microscope (*200) (b). ..	129
Photo 32 : Mattes de cyanobactéries (<i>Hydrocoleum lyngbyaceum</i>) observées lors de la première mission en mars 2005.....	130
Photos 33 et 34 : Couverture d' <i>Hydrocoleum</i> en ZT de 5A, à 5B et de 6A à 6B observée lors de la mission de novembre 2005 (L3). ..	130
Photos 35 et 36 : Couvertures de cyanobactéries, <i>Oscillatoria subuliformis</i> recouvrant la zone 5A et 5B en mai 2006.	130
Photos 37 et 38 : Couverture de <i>Spirulina weissii</i> en ZT (4A) observée lors de la mission de mai 2006 (L6) ; Vue rapprochée de cette Oscilloriale.....	131
Photos 39, 40 et 41 : Vues sous-marines de la ZNT (39) et patchs localisés de cyanobactéries (non déterminées) (40 et 41). ..	131
Photos 42 : ZNT, pied de la mise à l'eau des pirogues (site 2A) où l'on peut observer une fragilité des coraux, associée à un développement localisé de cyanobactéries du genre <i>Hydrocoleum</i> . ..	132
Photos 43 et 44 : Recouvrement de <i>S. weissii</i> (site 4B) et d' <i>Hydrocoleum</i> (site 5A) en juin 2008 (L13).....	132

Photos 45 et 46 : Apparition d' <i>Hydrocoleum glutinosum</i> en zone 4C observée en février 2008 (L12) à la limite de la zone 5C envahie par <i>S. weissii</i> (photo 32, ligne de tiret indiquant la limite de zone).....	133
Photos 47, 48 et 49 : Recouvrement d' <i>O. bonnemaisonii</i> , en début de développement en février 2009 (L15) sur substrat sableux (47) et en extension en août 2009 (48 et 49).	134
Photos 50 et 51 : Apparition d' <i>Oscillatoria</i> spp. en 3C.	134
Photos 52, 53 et 54 : Développement d' <i>Oscillatoria</i> spp. en zone (1A).	134
Photos 55 et 56 : Vues macroscopique (n°55) et microscopique (n°56) d' <i>Hydrocoleum lyngbyaceum</i> (Barre d'échelle = 50 µm).....	137
Photos 57 et 58 : Vues macroscopique (57) et microscopique (58) d' <i>Hydrocoleum glutinosum</i> (Barre d'échelle = 50 µm).	138
Photos 59 et 60 : Vues macroscopique (59) et microscopique (60) d' <i>Oscillatoria bonnemaisonii</i> (Barre d'échelle = 50 µm).	138
Photos 61 et 62 : Vues macroscopique (61) et microscopique (62) d' <i>Oscillatoria subuliformis</i> (Barre d'échelle = 50 µm).	139
Photos 63 et 64 : Vues macroscopique (63) et microscopique (64) de <i>Phormidium laysanense</i> (Barre d'échelle = 50 µm).	139
Photos 65, 66 et 67 : Vues macroscopique (65 et 66) et microscopique (67) de <i>Spirulina weissii</i> (*200).	140
Photos 68 et 69 : Vues macroscopique (68) et microscopique (69) de <i>Trichodesmium erythraeum</i> (Barre d'échelle = 50 µm).	140
Photos 70 et 71 : Destruction de corail du genre <i>Acropora</i> entre la zone 4A et 5A, laissant place au développement progressif de cyanobactéries du genre <i>Hydrocoleum</i> dans le zone au pied de la mise à l'eau à Lifou.	189
Photos 72 : <i>Stichopus chloronotus</i> présent en grande quantité dans la ZNT de Hunetë pendant toute la période d'étude.	191
Photos 73 et 74: <i>Acropora</i> spp. dégradés dans la zone dite toxique et présence de grandes mattes cyanobactériennes du genre <i>Anabaena</i>	195
Photos 75 et 76: Tapis cyanobactériens dominés par <i>Lyngbya sordida in natura</i> (75) et vue microscopique (76).	196

Photos 77, 78 et 79 : Espèces de poissons collectées lors de la première mission à Emau et déclarées fortement à risque par la population : <i>Lethrinus harak</i> , <i>Hipposcarus longiceps</i> et <i>Ctenochaetus striatus</i>	196
Photo 80 : (a) et (b) Efflorescences de <i>Trichodesmium erythraeum</i> à Lifou (Ile Loyauté)....	200
Photos 81, 82 et 83: Vues d'une efflorescence de <i>Trichodesmium</i> atteignant la surface dans la Baie de Santal à Lifou et se concentrant sur la rive (81, 82) ; technique de récolte utilisant la flottabilité des trichomes pour se concentrer en surface (83).	203
Photos 84, 85: Vues des trichomes arrangés en fagots (84), et vue microscopique de <i>T. erythraeum</i> collectés à Lifou en novembre 2009 (L17) (barre d'échelle = 5 µm) (85).....	204
Photo 86 : La baie de Prony, baie calme et enclavée aussi appelée la baie anticyclonique.	226
Photo 87 : Vallée de la Kwe Ouest où se construisent les bassins de stockage des résidus solides.....	228
Photos 88 et 89 : Usine en travaux en 2002 et en 2006.	229
Photo 90 : Vue aérienne de la base vie de l'usine du sud.....	230
Photos 91 et 92 : Vues du port de Prony au début de sa construction en 2002 et en fin de construction en 2007.....	231
Photos 93 et 94 : Vues aériennes du port constitué de ses deux quais montés sur pieux (93) dont l'un est relié à l'usine par un convoyeur (94).	231
Photo 95 : Zone d'immersion du tuyau, avril 2008	232
Photo 96 : Zone de pêche du port Z1, vue de l'enrochement côtier.....	238
Photo 97 : Exemple de cyanobactéries observées à Ouvéa en août 2007, Pléiades Nord à Angeu (C12).	246
Photos 98, 99, 100 : Quai de Wadrilla (98), site de prélèvement de <i>Digenea simplex</i> (99), support des cellules de <i>Gambierdiscus</i> observées au microscope optique (100) (diamètre ≈ 60µm).....	246
Photos 101, 102 : Tapis de cyanobactéries observés à Ouvéa en août 2007, Passe de la Calédonie dit chenal de Fayawa (C02).	247
Photos 103 et 104 : Tapis de cyanobactéries observés à Ouvéa en août 2007, Passe de Lifou, au pied des falaises de Lékiny (C09).....	247

Photos 105, 106, 107, 108: Vues <i>in situ</i> de différentes Oscillatoriales observées entre 2008 et 2009 à Port Boisé (105), Bonne Anse (106) et l'îlot Gabriel (107 et 108). Naturellement présentes, leurs étendues ne dépassent pas 1 m ²	258
Photos 109, 110, 111, 112: Vues <i>in situ</i> du tapis cyanobactérien dominé par <i>H. lyngbyaceum</i> et <i>H. glutinosum</i> recouvrant des débris coralliens en juin 2009 (109 et 110), en octobre 2009 (111) et en diminution à partir de décembre 2009 (112).	259
Photos 113 et 114 : Vues microscopiques de trichomes d' <i>H. lyngbyaceum</i> (113) et d' <i>H. glutinosum</i> (114) récoltées en novembre 2009 en site 4 à Prony (barre d'échelle = 50 µm).....	259
Photos 115, 116, 117 : Vues <i>in situ</i> du tapis cyanobactérien dominé majoritairement par <i>H. cantharidiosmum</i> recouvrant des débris coralliens en décembre 2009 (115) et avril 2004 (116) et vue microscopique (117), barre d'échelle = 50 µm).....	260
Photos 118 et 119 : Vues <i>in situ</i> de la zone du port en mai 2010, site 4 où a été observé de juin 2009 à février 2010 les tapis composés d' <i>H. lyngbyaceum</i> : les débris coralliens se recouvrent de macrophytes dont la Phéophycée du genre <i>Dictyota</i> (119).....	276

Préambule

Le phénomène ciguatérique est bien connu des populations du Pacifique. Intoxication alimentaire causée par la consommation de poissons contaminés, le syndrome peut présenter des symptômes caractéristiques comme l'inversion de la sensation de chaud et froid mais reste néanmois polymorphe. Les confusions avec d'autres intoxications marines provoquées par d'autres toxines ou par la consommation d'autres organismes marins ne sont pas rares. Les études sur l'aspect écologique de la ciguatéra existent mais restent peu nombreuses tant il est complexe.

Afin d'améliorer la compréhension dans le déterminisme du phénomène écotoxicologique de la ciguatéra, nous avons proposé ce travail de thèse d'une durée de trois ans. Il a pour défi de répondre aux besoins des populations en termes de connaissances et de surveillance de la ciguatéra. Ainsi, l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) et le Département environnement de la société Vale Nouvelle-Calédonie (Vale NC) ont conjointement porté ce projet à travers leurs soutiens scientifiques, financiers et d'expertises.

Articulé selon trois chapitres, ce rapport de thèse présente les fruits de ces travaux. Nous commencerons tout d'abord par présenter les intoxications alimentaires auxquelles les populations peuvent être confrontées lors de la consommation de produits marins. L'objectif est d'avoir une vue d'ensemble des différentes intoxications d'origine marine afin d'éviter les confusions possibles avec le syndrome de la ciguatéra pour lequel les connaissances actuelles seront également exposées. Ensuite, seront traités les deux axes principaux de la thèse : (i) l'implication des cyanobactéries comme nouvel agent ciguatoxinogène (Chapitre 2) et (ii) le développement des zones ciguatériques (Chapitre 3).

Chapitre 1 :

Intoxications alimentaires provoquées par les organismes marins

Chapitre 1 : Intoxications alimentaires provoquées par les organismes marins

I. Intoxications autres que la ciguatéra

L'océan est un vivier de ressources tant alimentaires que récréatives pour la population mondiale. Ainsi, 15% des protéines animales nécessaires à l'Homme proviennent de la mer. Chaque organisme a sa place dans ce milieu complexe regorgeant de vie et doit la défendre. L'océan n'est pas sans danger, particulièrement pour l'homme qui en tirant profit, peut aussi être confronté à un milieu à risque qui peut se retourner contre lui.

Les microalgues toxiques produisent des toxines qui sont bioaccumulées le long de la chaîne alimentaire et provoquent de nombreuses intoxications qui diffèrent selon leurs organismes producteurs, leurs vecteurs de transmission et leurs modes d'action. Depuis ces trente dernières années, la fréquence, l'intensité et la distribution géographique des efflorescences de ces algues toxiques n'ont fait qu'augmenter (FAO, 2004). Les intoxications alimentaires par consommation de produits d'origine marine liées aux développements de microalgues toxiques parfois mortelles, sont également en augmentation.

Les recherches sur la caractérisation des phénomènes d'intoxications alimentaires en terme d'écologie marine (microorganismes, toxines...) et en terme de mécanismes d'intoxications (symptômes, modes d'action des toxines...) ont pour objectif de développer des outils permettant de prévenir ces empoisonnements qui peuvent parfois être fatals.

Dans ce premier chapitre, nous présenterons les différents syndromes en mentionnant les toxines responsables, les vecteurs impliqués et leurs symptômes. Nous avons choisi de les classer selon les vecteurs de transmission des toxines : invertébrés et vertébrés, puis selon leurs symptômes. Puis, nous développerons le syndrome d'origine marine qui touche le plus grand nombre de personnes et qui nous intéresse plus particulièrement dans cette thèse: l'intoxication ciguatérique qui est généralement causée par l'ingestion de poissons contaminés.

I.1 Intoxications par les mollusques (invertébrés)

I.1.a Intoxication amnésique par les fruits de mer - IAFM ou ASP

Le syndrome d'intoxication amnésante par fruits de mer (**IAFM**) est connu sous la dénomination anglo-saxonne d'*Amnesic Shellfish Poisoning* (ASP). L'**acide domoïque** (AD) en est la principale neurotoxine responsable (figure 1E), et est synthétisée par certaines espèces de diatomées toxinogènes du genre *Pseudo-nitzschia*. Ses isomères, les acides isodomoïques, sont relativement moins fréquents et peu toxiques. Les vecteurs de cette toxine sont principalement les mollusques filtreurs. L'AD, structurellement proche de l'acide glutamique (neurotransmetteur), se fixe au niveau des récepteurs synaptiques et provoque

une dépolarisation de la membrane qui entraîne un dysfonctionnement des cellules ou leur mort (Frémy et Lassus, 2001).

Les premiers symptômes de type gastro-intestinal (vomissements, diarrhées, nausées...) surviennent dans un délai de 2 à 24 h après consommation des coquillages contaminés. Puis, entre 24 et 48 h, des symptômes neurologiques sont observés (maux de tête persistants, vertiges, amnésie transitoire, désorientation, confusion). Dans les cas les plus graves, il apparaît une perte de mémoire, des dommages cérébraux et parfois des convulsions ou un coma pouvant conduire à la mort (Frémy et Lassus, 2001). Les symptômes particuliers à l'IAFM sont les atteintes de la mémoire de type antérograde (difficultés à mémoriser des événements nouveaux) (Château-Degat, 2003).

I.1.b Intoxication diarrhéique par les fruits de mer - IDFM ou DSP

L'intoxication diarrhéique par les fruits de mer (**IDFM**) est un syndrome connu sous la dénomination anglo-saxonne de Diarrheic Shellfish Poisoning (DSP). Les toxines mises en cause sont l'**acide okadaïque** (AO) et ses dérivés, les dinophysistoxines (DTXs-1, -2, -3, -4) de la classe des toxines polyéthérées lipophiles (Van Dolah, 2000 ; Château-Degat, 2003) (figure 1D). Isolées et identifiées à l'origine à partir d'extraits d'éponge *Halichondria okadaï*, elles sont synthétisées par les dinoflagellés du genre *Prorocentrum* ou *Dinophysis* (Dickey *et al.*, 1990 ; Ten-Hage *et al.*, 2000). Elles sont thermostables et ne sont donc pas dégradées à la cuisson des produits de la mer. Quatre autres familles font partie des toxines diarrhéiques : les pectenotoxines, les yessotoxines, les azaspiracides et les toxines à action rapide (spirolides, gymnodimines, pinnatoxines, pteriatoxines et prorocentrolides) ou les FATs pour *Fasts-Acting Toxins*. Les vecteurs principaux sont les fruits de mer.

Les symptômes, apparaissant entre 30 mn et 12 h après le repas, sont des troubles gastro-intestinaux plus ou moins graves (diarrhée, vomissement, crampes abdominales). Des troubles neurologiques peuvent apparaître dans les cas les plus graves (hallucinations, vertiges...). L'IDFM touche en moyenne une centaine de personnes par an et reste sous-déclarée de par son caractère bénin. L'AO et ses congénères sont les toxines marines les moins dangereuses. Aucune mortalité n'a été rapportée (Château-Degat, 2003).

I.1.c Intoxication neurologique par les fruits de mer - INFM ou NSP

L'intoxication neurologique par les fruits de mer (**INFM**) est un syndrome connu sous la dénomination anglo-saxonne de *Neurotoxic Shellfish Poisoning* (NSP). L'organisme mis en cause est le dinoflagellé *Karenia brevis* (anciennement *Gymnodinium* cf. *breve*) produisant les **brévétoxines** (PbTxs), polyéthers cycliques liposolubles (figure 1B). Environ dix analogues sont issus de la biotransformation du précurseur dans les mollusques.

Ces neurotoxines activent les canaux sodium (Na^+) sensibles au potentiel (CSSP) et ont pour conséquence la dépolarisation des cellules nerveuses et musculaires engendrant des symptômes gastro-intestinaux, neurologiques (inversion des sensations de température) et cardio-vasculaires apparaissant après ingestion de coquillages contaminés. Des difficultés respiratoires peuvent survenir par inhalation d'embruns chargés de ces biotoxines en cas d'efflorescence importante et soumise à l'orientation défavorable des vents (Hansen *et al.*,

2001 ; Kirkpatrick *et al.*, 2006 ; 2008). Aucune mortalité humaine n'a été relevée (Frémy et Lassus, 2001), seules des mortalités massives de poissons, d'oiseaux et de mammifères marins ont été enregistrées (Kirkpatrick *et al.*, 2004). La zone d'endémie reste localisée au niveau des côtes de Floride, du Golfe du Mexique et en Nouvelle-Zélande (figure 2).

I.1.d Intoxication paralysante par les fruits de mer - IPFM ou PSP

L'Intoxication paralysante par fruits de mer (**IPFM**) est un syndrome connu sous la dénomination anglo-saxonne de *Paralytic Shellfish Poisoning* (PSP). Les toxines responsables de l'IPFM forment une famille d'une vingtaine de molécules chimiquement proches, dont la toxine de base est la **saxitoxine** (STX) (figure 1A). Cette phycotoxine paralysante a été isolée du mollusque bivalve *Saxidomus giganteus*. Les dérivés toxiques de la STX sont la néosaxitoxine puis les gonyautoxines purifiés à partir de microalgues du genre *Alexandrium* (anciennement *Gonyaulax*). Les STXs sont hydrosolubles, thermostables et stables en milieu acide (IFREMER, 2006).

Plusieurs espèces du genre *Alexandrium* ainsi que les espèces *Gymnodinium catenatum* et *Pyrodinium bahamense* sont productrices de toxines paralysantes. Les efflorescences de ces dinoflagellés marins peuvent provoquer d'impressionnantes marées rouges (« red tide »). Certaines cyanobactéries d'eau douce comme *Aphanizomenon* ou *Anabaena* produisent également des toxines paralysantes (Negri *et al.*, 2003). L'IPFM est rapportée partout dans le monde mais plus particulièrement dans les zones tempérées. Tous les mollusques filtreurs sont potentiellement des vecteurs de STXs (FAO, 2004).

Les STXs sont des neurotoxines agissant directement sur les mécanismes de transmission des influx nerveux en bloquant le passage des ions Na⁺ à travers les canaux sodiques au niveau des cellules excitatrices (nerveuses et musculaires). Les symptômes sont de type gastro-intestinal sévissant dans l'heure qui suit l'ingestion des organismes contaminés. Ils se traduisent par des paresthésies buccales, des engourdissements des lèvres s'étendant au visage, aux bras et aux jambes, des maux de tête, des nausées et des vertiges. Dans les cas plus graves, il est observé une incoordination motrice et une incohérence de la parole et on voit apparaître des paralysies respiratoires qui peuvent provoquer la mort dans 8 à 10% des intoxications. À travers le monde, en moyenne 2 000 cas d'IPFM sont déclarés annuellement (Frémy et Lassus, 2001 ; Llewellyn *et al.*, 2006).

Aucun antidote n'est connu à ce jour et la posologie est uniquement basée sur des soins palliatifs en support spécifique du système respiratoire. La prévention est donc primordiale. La méthode de référence de détection des STXs est basée sur le test souris (Référence 959-08, AOAC). Les coquillages sont considérés comme contaminés au-delà de 80 µg d'équivalent STX par 100 g de chair totale (Jellet *et al.*, 1992).

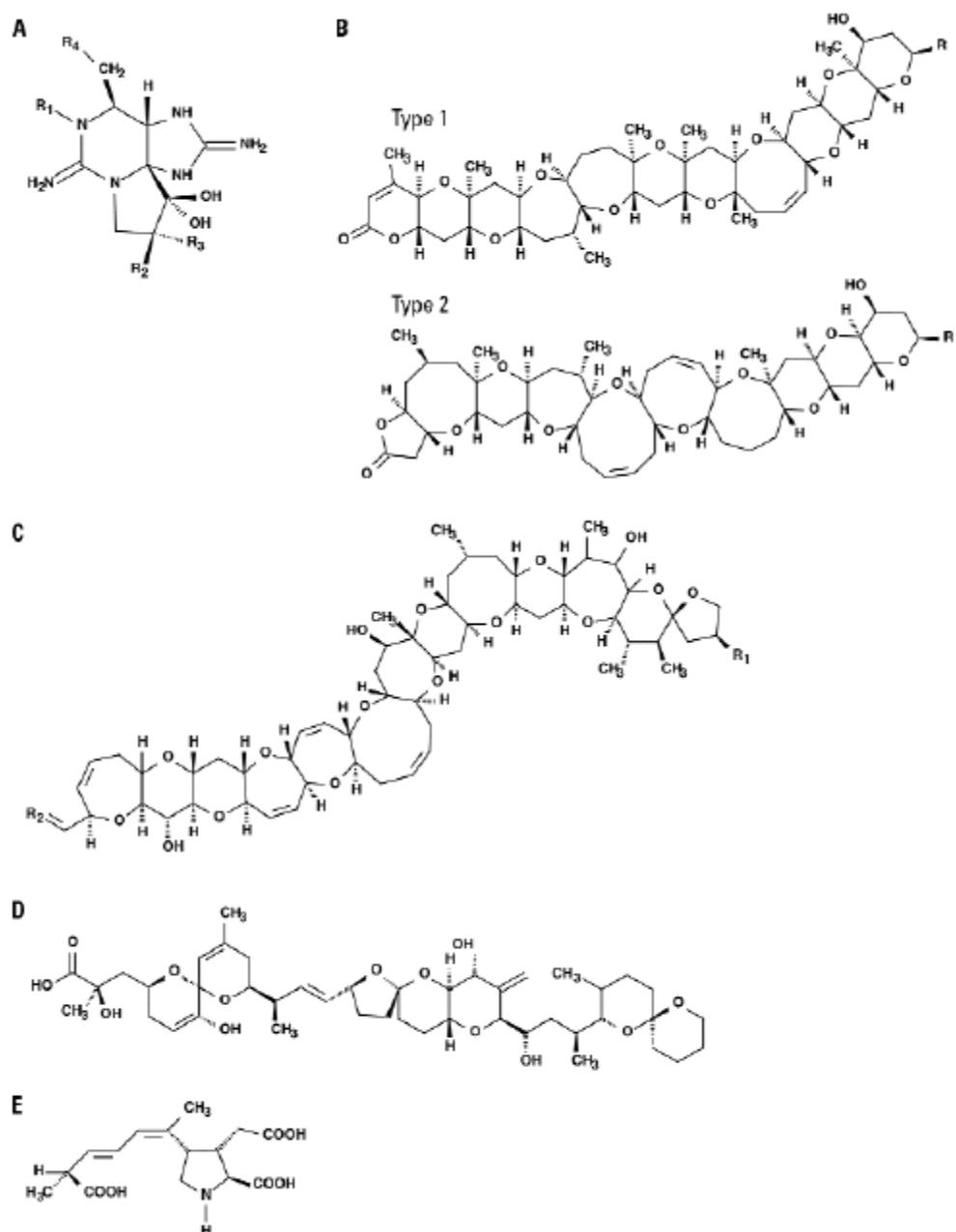


Figure 1 : Familles de toxines d'algues marines: (A) saxitoxine, (B) brévétoxine, (C) ciguatoxine, (D) acide okadaïque, (E) acide domoïque. (D'après Van Dolah, 2000).

D'autres intoxications par les invertébrés marins ont été rapportées en zones tropicales en Asie ou en Polynésie :

- holothuries, responsables de troubles digestifs (Conand, 1989),
- mollusques céphalopodes (calmars, poulpes) (Robertson *et al.*, 2004),
- mollusques bivalves (bénitiers responsables de décès par paralysie des muscles respiratoires ou de convulsions) ou gastéropodes (troca) (Bagnis, 1967 ; Angibaud *et al.*, 2000) (ch2.II.4.a).

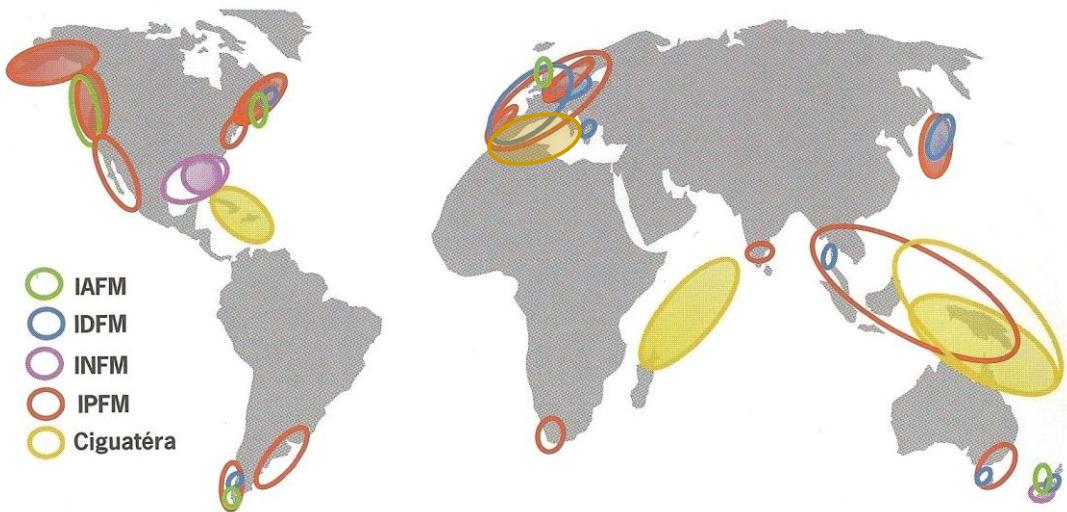


Figure 2 : Distribution des intoxications alimentaires par fruits de mer (d'après Frémy et Lassus, 2001 et Van Dolah, 2000).

I.2 Intoxications par les vertébrés

Le terme ichtyosarcotoxicose, du grec *ichtyos* (poisson), *sarcos* (chair) et *toxicon* (poison), désigne une forme d'intoxication consécutive à l'ingestion de chair de poisson. Il regroupe diverses intoxications par ingestion de poissons qui diffèrent selon les toxines impliquées et selon leurs symptômes. On retrouve : le scombrotoxicose, le tetrodotoxicose, le clupéotoxicose, le carchatoxicose ou encore la ciguatéra. D'autres vertébrés marins comme les tortues (chélonotoxicose) peuvent également être vecteurs de toxines.

I.2.a Le scombrotoxicose ou intoxication histaminique

Le scombrotoxicose a été mis en évidence lors d'intoxications par la consommation de poissons de la famille des Scombridés (thons, bonites, maquereaux). Il touche de nombreuses autres espèces (anchois, sardines, mahi-mahi, harengs, loche...) (Hungerford, 2010).

Les chairs de poissons contaminés ont un niveau élevé en **histamine** (figure 3a). À la suite d'une mauvaise conservation (rupture de la chaîne du froid), on observe une dégradation bactériologique de l'histidine en histamine par décarboxylation. Sa distribution géographique n'est pas définie car elle est contextuelle et dépendante de la conservation du poisson (Hahn and Capra, 2003).

L'intoxication histaminique survient lorsque la concentration en histamine atteint une teneur de 0,6 g / kg de chair. Les premiers symptômes apparaissent souvent dans la demi-heure qui suit le repas. Ils sont similaires à une allergie (rougeur du visage, tachycardie, bouffées de chaleur, urticaire, hypotension artérielle, œdème facial, vomissement). Des symptômes de prurit peuvent rendre le diagnostic difficile par confusion avec ceux de la ciguatéra. Le traitement du scombrotoxicose repose sur la prise d'antihistaminiques.

I.2.b Le tétrodotoxisme

Le tétrodotoxisme ou fugu est dû à la consommation de poissons de la famille des Tétraodontidés, des Diodontidés ou des Balistidés (poisson globe, poisson ballon, poisson lune...). Plus fréquente en Asie (Hong-Kong, Japon, Malaisie) et en Polynésie, des cas d'intoxications ont cependant été recensés au Maroc, à La Réunion, en Californie et à Madagascar. La toxine mise en jeu est la **tétrodotoxine** (TTX), neurotoxine localisée dans les ovaires, les viscères et la peau (figure 3b). Elle est synthétisée par diverses souches bactériennes marines et terrestres du genre *Vibrio*, *Shewanella* et *Alteromonas* (Noguchi *et al.*, 2008). La TTX a également été isolée d'autres organismes comme les céphalopodes ou les gastéropodes, qui sont en fait les vecteurs de transmission pour les poissons (FAO, 2004).

Les premiers signes cliniques apparaissent dans les trois heures qui suivent le repas avec apparition de symptômes de type gastro-intestinal (diarrhées, vomissements) et neurologique (paresthesies buccales et des extrémités, ataxie, mydriase). L'évolution peut être grave par une installation progressive dans le coma qui peut être irréversible (Château-Degat, 2003). Après 24 h, l'issue est généralement favorable. Elle entraînerait 300 intoxications par an avec un taux de mortalité pouvant atteindre 60%, 2 mg de TTX suffisant à tuer une personne (FAO, 2004). Il n'y a pas d'antidote connu (de Haro, 2008).

I.2.c Le clupéotoxisme

Le clupéotoxisme est une intoxication redoutable après ingestion de poissons pélagiques planctonophages de la famille des Clupéidés, sardines ou d'anchois des mers tropicales. Les dinoflagellés benthiques du genre *Ostreopsis* en seraient à l'origine (Onuma *et al.*, 1999 ; Katikou, 2008). Cette microalgue est connue pour produire des analogues de la **palytoxine** (PTX), une des neurotoxines les plus puissantes synthétisées par des organismes marins (figure 3c) (Guerrini *et al.*, 2010) (cf. ch2.III.4.b).

La contamination se fait par consommation des produits de la pêche contaminés. Ce syndrome conduit à un tableau clinique grave dans l'heure suivant la consommation du poisson. Les symptômes se manifestent brutalement et sont proches de la ciguatéra avec une prédominance des signes neurologiques (goût métallique, délire, agitation, altération de l'état de conscience, paralysie généralisée), des troubles digestifs sévères, et des difficultés respiratoires. Le taux de mortalité est important (20%). Le traitement des intoxications humaines reste jusqu'à présent symptomatique (de Haro, 2008).

I.2.d Le carchatoxisme

Le carchatoxisme est dû à l'ingestion de chair de requins de diverses espèces (*Carcharhinus albimarginatus*, *C. sorrah*, *C. leucas*, *Sphyrna lewini*). Les toxines identifiées sont les **carchatoxines A et B** (Boisier *et al.*, 1995). Le tableau clinique est proche de la ciguatéra avec des signes majoritairement neurologiques mais des troubles cardiaques plus sévères (bradycardie, troubles du rythme cardiaque) et des difficultés respiratoires pouvant être plus importantes : on peut noter également une altération de l'état de conscience. Ces symptômes surviennent de 2 à 12 h suivant le repas. La principale zone concernée est

Madagascar où des intoxications collectives ont été décrites (Boisier *et al.*, 1995 ; Champetier de Ribes *et al.*, 1997). Les mortalités relevées dans la littérature varient de 1 à 30% (Champetier de Ribes *et al.*, 1997 ; De Haro, 2008). Le traitement reste symptomatique et très similaire à celui prescrit lors des intoxications ciguatériques.

L'étude des toxines a montré de fortes similarités en termes de propriétés chimiques et de toxicité avec les CTXs : les mêmes symptômes sont observés en test « souris » avec une toxicité plus aiguë pour les carchatoxines A et B (Boisier *et al.*, 1995 ; Yasumoto, 1998). Il est fort probable que les carchatoxines A et B soient issues de la biotransformation des CTXs par le métabolisme des requins. Cette hypothèse pourrait expliquer les similitudes entre le carchatoxisme et la ciguatéra (Quod and Turquet, 1996 ; Hamilton *et al.*, 2009).

I.2.e Le chélonitoxisme

Le chélonitoxisme est dû à l'ingestion de chair de tortues marines (*Chelonia mydas* et *Eretmochelys imbricata* essentiellement). Des cas d'intoxications ont été observés dans les océans Indien et Pacifique (Fussy *et al.*, 2007). Plusieurs heures voire plusieurs jours après un repas, des symptômes majoritairement gastro-intestinaux surviennent (vomissements, diarrhée) ainsi que des déshydratations, une hypotension artérielle, des ulcérasions de la cavité buccale et de la langue. Le taux de mortalité est élevé (4 à 7,5%) (de Haro, 2008).

La **lyngbyatoxine A** (figure 3d) a été identifiée par techniques chromatographiques (LC-MS) dans les chairs de *Chelonia mydas* (la tortue verte herbivore) (Yasumoto, 1998). Cette toxine est synthétisée par *Lyngbya majuscula*, une espèce de cyanobactérie filamenteuse productrice de nombreux métabolites secondaires (Osborne *et al.*, 2001) qui est broutée par *C. mydas* (Ito *et al.*, 2002 ; Arthur *et al.*, 2008). Cependant, *E. imbricata* étant exclusivement carnivore (Fussy *et al.*, 2007) si *L. majuscula* est bien à l'origine du chélonitoxisme alors il existerait un ou d'autres maillons de la chaîne alimentaire de bioaccumulation.

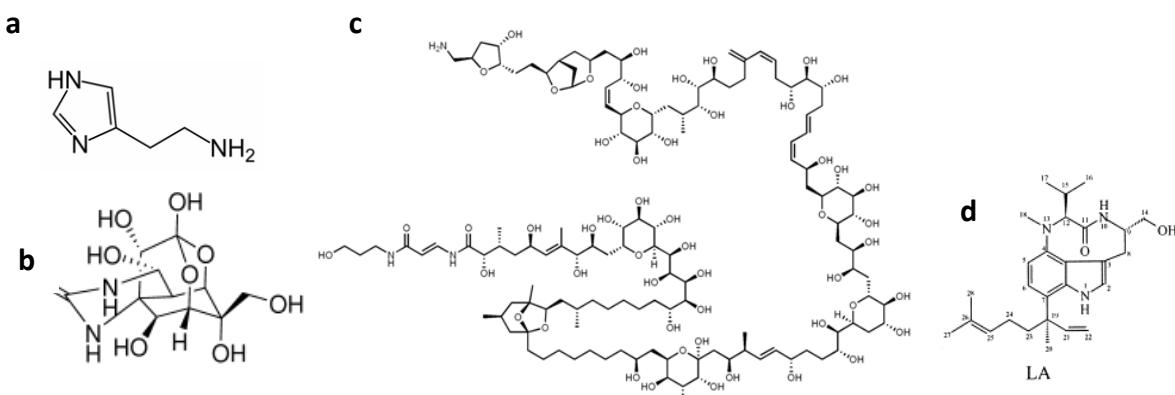


Figure 3 : (a) structure de l'histamine, responsable du scombrotoxisme, (b) structure de la tétradotoxine, responsable du tétradotoxisme, (c) structure de la palytoxine, toxine fortement suspectée d'être responsable du clupéotoxisme et (d) structure de la lyngbyatoxine, impliquée dans le chélonitoxisme.

I.2.f Autres types d'intoxication moins fréquente

Syndrome hallucinatoire (ichtyoalleinotoxisme).

La consommation des poissons de récifs herbivores de la famille des Acanthuridés, Mugilidés, Mullidés, Siganidés peut être responsable du syndrome hallucinatoire (ou ichtyoalleinotoxisme). Les symptômes apparaissent rapidement et sont de type neurologique (hallucinations, vertiges, cauchemars, troubles du comportement et de la coordination motrice). Des observations ont été rapportées dans l'Océan Indien, et surtout dans l'Océan Pacifique (rites religieux) (de Haro, 2008)

I.3 A chaque phycotoxine, son syndrome ?

Les phycotoxines, synthétisées par les microalgues toxiques, constituent un danger potentiel particulièrement lors des phases d'efflorescence (ou HAB de l'anglais *Harmful Algal Bloom*). Elles regroupent une large classe de composés, de structure chimique très diverses (alcaloïde, acide aminé, peptide ou polyéther) et de fonctionnalité très variable. Les microalgues productrices (diatomée, dinoflagellé) sont, elles, aussi très diverses pouvant être à l'origine d'intoxications qui ont été classées selon les vecteurs de transmission et selon le type de symptômes majeurs.

Afin d'avoir une vue d'ensemble des informations présentées dans cette première partie, le tableau 1 synthétise les différents syndromes rencontrés en milieu marin et leurs caractéristiques, les phycotoxines incriminées et leurs organismes producteurs.

Tableau 1: Synthèse des informations sur les intoxications alimentaires par consommation de produits de la mer (d'après Château-Degat, 2003; Van Dolah, 2000 ; Frémy et Lassus, 2001).

Syndrome	Toxine				Intoxication			
	Nom	Toxicité	Producteurs	Vecteur	Taux de mortalité	Symptômes généraux	Symptômes particuliers	
IAFM (ASP) Intoxication amnésique par les fruits de mer	Acide domoïque	120 µg / kg	Diatomées <i>Pseudo-Nitzshia</i>		3%	GI N R	Amnésie	
IDFM (DSP) Intoxication diarrhéique par les fruits de mer	Acide okadaïque, Dinophysistoxines, Pectenotoxine, Yessotoxine	192 µg / kg	Dinoflagellés <i>Prorocentrum</i> spp.		0%	GI N		
INFM (NSP) Intoxication neurologique par les fruits de mer	Brévétoxines	100-200 µg / kg	Dinoflagellés <i>Karenia breve</i>		0%	GI N R		
IPFM (PSP) Intoxication paralysante par les fruits de mer	Saxitoxines, Gonyautoxine	9-11,6 µg / kg	Dinoflagellés et Cyanobactéries		1-14%	N GI		
Ciguatéra	Ciguatoxines, Maitotoxines Autres toxines ?	0,25-3,6 µg / kg 0,13 µg / kg	Dinoflagellés <i>Gambierdiscus</i> spp.		<0,1%	N GI	Prurit, Inversion des sensations	
Scombrotoxisme	Histamine	-	Bactéries		ND	Type allergisant		
Tétrodotoxisme	Tétrodotoxines		Bactéries		60%	N	Mort fréquente	
Clupéotoxisme	Palytoxine et analogues Autres toxines ?	ND	Dinoflagellés <i>Ostreopsis</i> spp.		20%	N GI	Prurit, coma, mort	
Carchatoxisme	Carchatoxines A et B	ND			1-30%	N GI	Formes graves	
Accidents hallucinatoires	Diverses toxines ?	ND	ND			N	Hallucinations vertiges	
Chélonitoxisme	ND – Lyngbyatoxine	ND	Cyanobactéries <i>Lyngbya majuscula</i>		4 à 7,5%	GI	Formes bénignes à graves	

Vectoris : : mollusques coquillages; : poissons ; : tortues - Symptômes: N : type neurologique ; GI : type Gastro-intestinal; R ; type respiratoire - ND : Non déterminé

II. La ciguatéra

II.1 Généralités

Le terme « ciguatéra » désigne une intoxication alimentaire causée par la consommation d'organismes marins porteurs de ciguatoxines, c'est une des formes d'ichtyosarcotoxicose. Elle est à ce jour la plus importante intoxication d'origine marine. Ce terme désigne également le phénomène écotoxicologique correspondant à la perturbation d'un milieu corallien propice à la prolifération de micro-organismes ciguatoxinogènes.

Les vecteurs les plus communément cités pour les cas d'intoxication ciguatérique sont les poissons récifaux, d'où la dénomination anglophone de *Ciguatera Fish Poisoning* (CFP). Cette appellation ne sera pas utilisée dans ce présent document car la thèse soutenue remet en cause cette classification. Nous parlerons de « ciguatéra » ou « d'intoxication ciguatérique classique » si le vecteur est un poisson ou « d'intoxication de type ciguatérique » si le vecteur n'est pas un poisson. Tenant compte des nouvelles connaissances présentées dans ce manuscrit, le terme anglo-saxon *Ciguatera Shellfish Poisoning* pourra être proposé.

Cette deuxième partie concernant l'intoxication ciguatérique, introduite par quelques repères historiques, nous permettra de faire le point sur les connaissances actuelles du phénomène sur les aspects épidémiologiques, socio-économiques, toxicologiques, les méthodes de détection des toxines impliquées et enfin l'aspect qui nous intéresse plus particulièrement, l'aspect écologique.

II.2 Historique

II.2.a Quelques repères

Cette affection est connue depuis la haute Antiquité. On en retrouve la trace, tant dans l'ancienne Egypte, plus de 2000 ans avant JC qu'en Chine au début de l'ère chrétienne. Les anecdotes rapportées par les navigateurs Fernandez de Quiros et Cook entre le 16^{ème} et 18^{ème} siècle de notre ère ne font que confirmer l'ancienneté du phénomène. En 1520, le chroniqueur à la cour d'Espagne, Pedro Martyr D'Anghera rapporte des cas d'intoxication dans l'équipage de Vasco de Gama, Christophe Colomb ou encore Fernand de Magellan aux Antilles (FAO, 2004).

En 1675, John Lock, philosophe anglais, décrit pour la première fois de manière clinique ce syndrome qui touche bon de nombre d'équipages en ces périodes de grandes expéditions. Il décrit plus particulièrement l'intoxication sévissant lors d'un voyage aux Bahamas : "Certains poissons là-bas sont empoisonnés entraînant de sévères douleurs dans les articulations de ceux qui les mangent et aussi des démangeaisons... Ces troubles disparaissent en deux ou trois jours... Dans un lot de poissons de même espèce, taille, forme, et goût, seuls certains spécimens renferment le poison, les autres n'entraînent aucun préjudice chez l'homme... Nous n'avons jamais entendu dire que la maladie fût mortelle,

mais pour les chats et les chiens qui consomment ces poissons, c'est souvent le dernier repas... Chez des gens qui ont eu une fois cette maladie, une nouvelle ingestion de poisson, même sain, peut raviver le ferment toxique dans l'organisme et faire réapparaître les douleurs...".

En 1748, à l'Île Rodrigue (Archipel des Mascareignes, Océan Indien), une importante intoxication des équipages de la flotte de l'amiral Boscawen provoque la mort de 1 500 hommes probablement déjà affaiblis par les conditions de vie à bord (Halstead, 1965).

En 1774, le capitaine Cook et son naturaliste Forster sont victimes d'une intoxication à Tanna aux Nouvelles-Hébrides(actuellement Vanuatu, Océan Pacifique), il en fait une description précise dans son journal de bord : « Dans l'après-midi, un des naturels, ayant harponné un poisson, mon secrétaire l'acheta et me l'envoya après mon retour. Il était d'une nouvelle espèce, un peu comme un poisson-soleil, avec une grosse tête longue et hideuse. Ne nous doutant pas qu'il pouvait nous empoisonner, nous donnâmes l'ordre de l'apprêter pour le souper. Mais par bonheur il fallut si longtemps pour le dessiner et le décrire qu'il n'était plus temps de le faire cuire, de sorte qu'on n'apprêta que le foie et les rognons auxquels monsieur Forster et moi goûtâmes tout juste. Vers trois heures du matin, nous nous trouvâmes atteints d'une extraordinaire faiblesse et d'un engourdissement de l'ensemble des membres. J'avais presque perdu le sentiment du toucher et je ne pouvais distinguer, entre ceux que j'avais la force de soulever, les corps lourds des légers. Un quart d'eau et une plume avaient le même poids pour ma main. Nous prîmes l'ensemble des deux de l'émétique et après cela nous fîmes une suée qui nous apporta énormément de soulagement. Le matin, un des cochons qui avait mangé les entrailles fut trouvé mort. ».

En 1787, le naturaliste portugais Don Antonio Parra dans sa « Descripción de Diferents Piezas» fait référence à un syndrome neurologique qu'il nomme « siguatera » (Halstead, 1965). Ce nouveau terme est dérivé de l'appellation du gastéropode *Turbo* (*Cittarium* ou *Livona pica*) nommé « *sigua* » au 18^{ème} siècle dans les Antilles espagnoles (photo 1). Ce mollusque est connu pour provoquer une intoxication neuro-digestive. La dénomination est progressivement transférée à la maladie causée par certains poissons de récifs. C'est en 1967, que l'équipe de Scheuer introduit le terme de « Ciguatoxine » (CTX), le composé majeur identifié dans l'extrait de chair de murène (Scheuer, 1967).



Photo 1 : *Livona pica*, le turbo nommé *sigua* qui provoque des intoxications neuro-digestives à l'origine du nom ciguatéra.

II.2.b Les étapes clés dans l'avancée des recherches

Les recherches sur cette intoxication ont débuté dans la première moitié du 20^{ème} siècle dans l'Océan Pacifique où la prévalence est la plus importante (Dawson, 1959).

II.2.b.1 Biologie- Ecologie

Dès 1808, l'idée d'une algue marine impliquée dans le phénomène de l'intoxication par les poissons de récifs est émise par le docteur Chisholm (1808). Une étude conséquente est menée depuis 1913 dans l'atoll de Palmyra situé près de l'équateur à 1 500 km au sud d'Hawaii, sur les liens existant entre le comportement alimentaire des poissons et leurs caractères toxiques (Dawson *et al.*, 1955 ; Dawson, 1959). En 1958, le professeur Randall propose l'idée d'un organisme benthique proliférant sur des substrats vierges qui serait la source de contamination de la chaîne alimentaire.

En 1977, l'équipe du docteur Yasumoto identifie un dinoflagellé comme agent causal nommé alors *Diplopsalis* (Yasumoto *et al.*, 1977 ; Yasumoto *et al.*, 1979 ; Taylor, 1979 ; Bagnis *et al.*, 1980), puis renommé *Gambierdiscus toxicus* (Adachi and Fukuyo, 1979) après sa découverte dans l'archipel des îles Gambier de Polynésie Française (Bagnis *et al.*, 1980). Ces dinoflagellés ont été découverts en grande quantité dans le contenu stomacal du poisson chirurgien *Ctenochaetus striatus* (photo 2), poisson connu pour être ciguatoxique mais également pour être la proie de carnivores contaminés : le puzzle du transfert de la ciguatoxicité à travers la chaîne trophique se confirme (Yasumoto *et al.*, 1977).



Photo 2: *Ctenochaetus striatus*

II.2.b.2 Toxine et mécanisme d'action

La CTX de chair de murènes a été caractérisée en 1967 par Scheuer. Ce sont quelques années plus tard, que l'une des cibles des CTXs est identifiée : elles agissent spécifiquement sur le canal Na^+ (Bidard *et al.*, 1984) et se fixent, plus particulièrement, sur le site 5 de la protéine. Ce site de fixation est commun aux brévétoxines (PbTxs), mais l'affinité des CTXs est 20 à 50 fois plus grande que celle des PbTxs (Lombet *et al.*, 1987).

II.2.b.3 Traitement

En 1988, le mannitol administré par voie intraveineuse (i.v.) est introduit dans le traitement de la ciguatéra pour soigner les symptômes des malades intoxiqués hospitalisés (Palafox *et al.*, 1988 ; Blythe *et al.*, 1994).

II.2.b.4 Structure des toxines

Initié par le département de chimie de l'Université d'Hawaii, l'isolement, la purification et la détermination de la structure de la première CTX et de son précurseur, la Gambiertoxine (GTx), a été possible en 1989 à partir de la murène *Gymnothorax javanicus* (photo 3) et de cellules sauvages de *Gambierdiscus* (Murata *et al.*, 1989). Puis, grâce aux techniques de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), l'élucidation structurale des congénères a très vite progressé (Yasumoto *et al.*, 1987).



Photo 3 : *Gymnothorax javanicus*, l'extraction de son foie a permis l'élucidation structurale des premières CTXs.

A ses débuts, la recherche coordonnée par le Secrétariat de la Communauté du Pacifique (CPS) a été initiée par la collaboration des équipes américaines de Californie (A. Halstead *et al.*), d'Hawaii (Banner *et al.*, P. Scheuer *et al.*), japonaise (T. Yasumoto *et al.*) et polynésienne (R. Bagnis *et al.*). Leurs efforts mutualisés ont ouvert la recherche vers de nombreux domaines que sont : l'épidémiologie (clinique, thérapeutique, incidence sanitaire et socio-économique), l'étude des traitements (ethnopharmacologie et pharmacochimie), des toxines (identification, synthèse, mode d'action, chimie d'extraction), des organismes précurseurs (identification, description, biologie des espèces, culture, toxinogenèse), l'élaboration d'outils de détection et de dosage des CTXs, l'écologie et les facteurs favorisant les zones ciguatoxiques, l'élaboration d'outils de gestion du risque (prévention, outils de surveillance environnementaux). Aujourd'hui, les diverses équipes à travers le monde travaillant sur ces spécialités ont pu se retrouver lors du colloque sur « la ciguatéra et les biotoxines associées » qui a eu lieu à Nouméa en 2008, initié par l'IRD, l'Institut Pasteur, la CPS et l'Institut Louis Malardé (ILM).

L'approche pluridisciplinaire reste essentielle pour l'avancement des connaissances dans le phénomène de la ciguatéra. Certains de ces aspects sont présentés dans cette partie telles que les données épidémiologiques, socio-économiques, toxicologiques (toxines et détection) et enfin écologiques.

II.3 Aspects épidémiologiques

II.3.a Zone d'endémie

L'intoxication touche majoritairement les bandes côtières de l'ensemble de la zone tropicale et subtropicale (35°N à 35°S) avec une prévalence supérieure dans les zones insulaires tropicales. Elle est présente dans tout le Pacifique sud (Polynésie française, Nouvelle-Calédonie, Australie, Vanuatu, Micronésie, Tokelau, Tuvalu, Mariannes du Nord, îles Marshall, îles Cook, Kiribati, Fidji, Tonga, Samoa, Guam...), dans le Pacifique nord (Hawaï, Japon...), dans l'océan Indien (Île Maurice, Seychelles...), dans les Caraïbes, en Floride, etc (figure 4).



Figure 4 : Zones touchées par les intoxications ciguatériques.

Cependant, en raison de l'augmentation des échanges mondiaux, les intoxications touchent maintenant également les populations des zones habituellement indemnes, soit par importation de poissons tropicaux soit par le déplacement des personnes dans les zones endémiques (tourisme, voyage...) (Vigneau *et al.*, 2008 ; Moulignier *et al.*, 1995 ; Center for disease control and prevention (CDC), 1998). Ces zones d'endémie tendent à s'accroître. Plus récemment, des cas d'intoxication ainsi que la détection de poissons ciguatériques ont été rapportés aux îles Canaries (Perez-Arellano *et al.*, 2005), au large du Cameroun (Bienfang *et al.*, 2008), dans l'Ouest du Golf du Mexique (Villareal *et al.*, 2007), et en Crète (Aligazaki and Fraga, 2008 ; Aligazaki *et al.*, 2008 ; 2009), dans des zones à priori jusque là indemnes. Pour ces deux dernières études, il est à noter que la présence de populations de *Gambierdiscus* a également été rapportée. Cette extension peut être expliquée par l'augmentation des zones propices au développement des dinoflagellés ciguatérigènes due au réchauffement climatique (augmentation des températures (Château-Degat *et al.*, 2005 ; Llewellyn, 2009)), à des événements climatiques majeurs (Hales *et al.*, 1999) ou à l'impact de l'activité humaine

(dégradation des espaces et créations de substrats vierges) qui leur confèrent de nouveaux biotopes favorables. Ce serait le cas des plates-formes pétrolières offrant de nouveaux terrains de développement à ces organismes précurseurs de la ciguatera dans le nord-est du Golfe du Mexique (Villareal *et al.*, 2007).

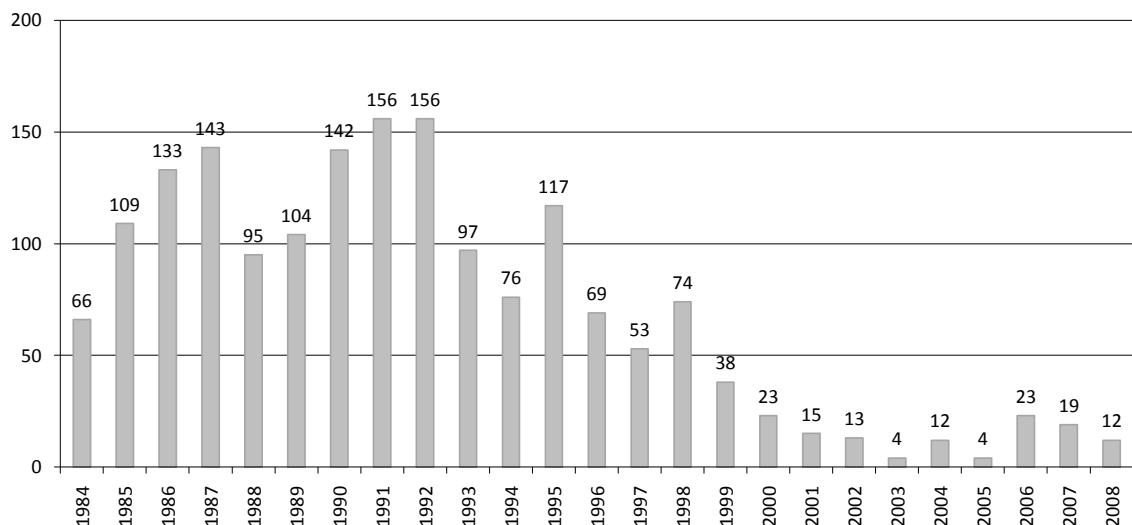
II.3.b Incidence

La ciguatera est l'intoxication par organismes marins qui affecte le plus grand nombre de personnes. Le nombre de cas relevé dans la littérature est très variable : de 20 000 à 500 000 personnes par an contracteraient le syndrome ciguatérique (Fleming *et al.*, 2006 ; Vigneau *et al.*, 2008). Dans le Pacifique Sud, cette intoxication est une des principales causes de morbidité avec une incidence annuelle de 500 cas pour 100 000 habitants (Vaillant *et al.*, 2001) et pouvant atteindre 1 200 cas d'intoxications dans certains états insulaires dépendant des ressources marines (Bruslé, 1997). Une étude de 2005 a montré qu'en Nouvelle-Calédonie, le tiers de la population interrogé (559 patients) a été intoxiqué au moins une fois ; ces données comparées aux études épidémiologiques antérieures montrent une augmentation de la prévalence de la ciguatera sur le territoire (Laurent *et al.*, 1993 ; Baumann *et al.*, 2009). Dans les zones endémiques de la ciguatera, ce taux varie de 0,1% jusqu'à 50% de la population (Dickey and Plakas, 2010).

L'intoxication provoque, fort heureusement, peu de cas mortels avec un taux inférieur à 0,1% des cas. Une des raisons évoquées par Lewis est la mortalité chez les poissons dont les teneurs en toxines seraient trop importantes (Lewis and Ruff, 1993 ; Dickey and Plakas, 2010).

Cependant, l'incidence réelle de la ciguatera est difficile à évaluer et les chiffres sont à prendre avec précaution tant l'exhaustivité du recueil d'informations épidémiologiques est variable selon la zone géographique (SPEHIS, 1996 ; Llewellyn, 2009). Dans les zones endémiques, elles varient selon le développement du réseau de surveillance et les moyens qui leur sont attribués par les services publics (questionnaire adapté, sensibilisation et implication du personnel médical). Aux États-Unis, les « centres de contrôle et de prévention des maladies » (CDC) estiment que le nombre de cas rapportés ne reflèterait que 2 à 10% des cas réels (Lewis and Ruff, 1993 ; Villareal *et al.*, 2007 ; Vigneau *et al.*, 2008).

Les cas d'intoxications déclarés en Nouvelle-Calédonie ont fortement baissé depuis la fin des années 1990 (figure 5) ce qui est en contradiction avec les données recueillies lors de l'étude de 2005 (Baumann *et al.*, 2009) où la prévalence des intoxications est en augmentation. Ainsi, la diminution des cas rapportés serait plutôt à attribuer à une sous-déclaration des cas.



**Figure 5 : Nombre de cas d'intoxication ciguatérique déclarés en Nouvelle-Calédonie de 1984 à 2008
(Données DPASS, 2009).**

Cette sous-déclaration peut être expliquée par différentes raisons : (i) la personne se soigne en tribu directement par la médecine traditionnelle ; (ii) le dispensaire est trop éloigné ; (iii) le manque de conviction en une amélioration possible par un phénomène connu (le recours au médecin n'est pas une nécessité) ; (iv) ou enfin la maladie n'est pas diagnostiquée dans les zones non endémiques (Friedman *et al.*, 2008 ; Dickey and Plakas, 2010).

Enfin, ces données doivent être reliées à l'importance relative qu'occupe le poisson dans l'alimentation humaine. Certaines îles ou atolls ont en effet une alimentation monotone à base de poisson, ce qui accroît considérablement le risque individuel d'intoxication ciguatérique.

II.3.c Syndrome polymorphe

L'ingestion de divers organismes marins contaminés par les CTXs peut provoquer le syndrome de la ciguatera présentant un tableau clinique polymorphe. Les symptômes cliniques peuvent être classés en quatre groupes : neurologiques, gastro-intestinaux, cardio-vasculaires et généraux. Chez l'Homme, ils peuvent se manifester à partir de 0,1 µg équivalent de P-CTX-1B par kg de chair de poisson (soit 0,1 nmole de P-CTX-1 / kg) (Lewis and Ruff, 1993 ; Lehane and Lewis, 2000). Il se traduit majoritairement par des troubles digestifs dans les heures suivant le repas (diarrhée, vomissements) suivis de troubles neurologiques (dysesthésie, paresthésies, myalgies, arthralgie, prurit), et dans les cas les plus graves par des troubles cardio-vasculaires (hypotension artérielle, bradycardie) (figure 6).

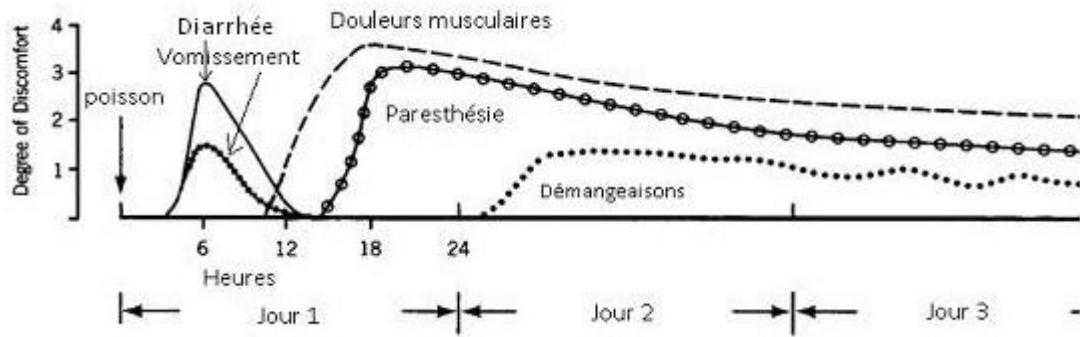


Figure 6: Evolution des symptômes au cours des trois premiers jours d'intoxication ciguatérique (d'après Lawrence *et al.*, 1980).

La sévérité et le nombre de symptômes dépend de la quantité et du type de CTXs ingérées, mais également du « passé ciguatérique » du patient. En général, l'évolution est favorable au bout d'une semaine, mais pour les cas les plus sensibles ou les personnes les plus contaminées, les symptômes de types neurologiques peuvent perdurer (dysesthésie, prurit...). Les études épidémiologiques menées en 1979 et en 2007 en Polynésie française (Bagnis, 1979 ; Château-Degat *et al.*, 2007 ; 2009) montrent la prédominance de symptômes neurologiques dans près de 90% des cas (figure 7).

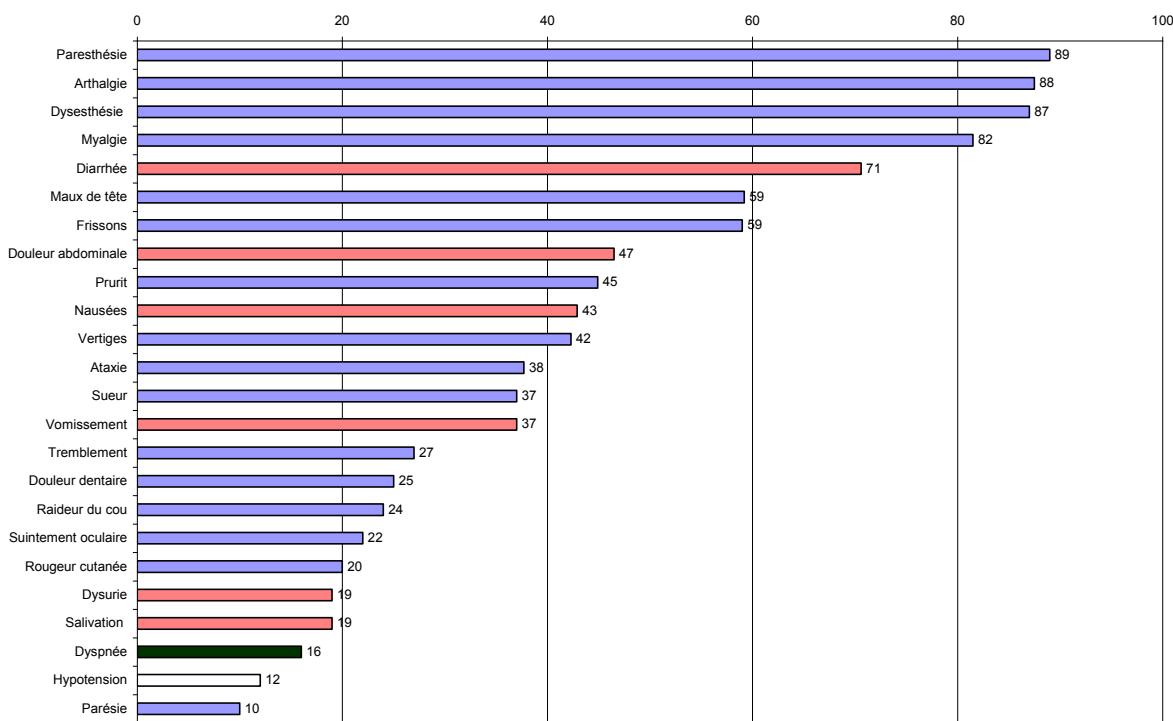


Figure 7 : Classement par ordre décroissant (Fréquence, %) des symptômes observés sur 3009 cas d'intoxications ciguatériques ; les symptômes sont classés en quatre groupes : neurologiques (bleu), gastro-intestinaux (rose), cardio-vasculaires (blanc) et généraux (noir) (Données de Bagnis, 1979).

II.3.c.1 Diagnostic différentiel

Actuellement, le diagnostic d'une intoxication ciguatérique par le personnel médical ne se base que sur l'analyse du tableau clinique et l'anamnèse du patient (Friedman *et al.*, 2008). Certains symptômes de la ciguatéra sont communs à d'autres ichtyosarcotoxismes (cf. ch1.I.2), par contre les manifestations comme les démangeaisons, le goût modifié (sensation métallique), l'inversion des sensations (chaud/froid) sont plus atypiques. Ainsi, l'association de ces signes neuropathiques particuliers et d'un syndrome digestif permet d'orienter vers le syndrome ciguatérique.

En Polynésie et en Nouvelle-Calédonie, ce sont les formes neurologiques qui dominent : près de 90% des patients rapportent des paresthésies, des arthralgies ou myalgies (figure 7) dans les premières heures suivant le repas. Tandis que dans les Caraïbes, les premiers symptômes sont de type gastro-intestinal, les symptômes neurologiques apparaissant 24 h après l'ingestion de l'organisme contaminé. A la Réunion, les symptômes rapportés sont similaires à ceux de la région Pacifique, avec en plus des symptômes hallucinatoires observés dans 16% des cas déclarés (Quod et Turquet, 1994). Le tableau clinique varie selon les régions où le poisson a été pêché, cette variabilité pouvant s'expliquer par les divers profils toxiniques en CTXs des poissons ingérés, eux-mêmes directement liés aux différentes espèces de *Gambierdiscus* productrices de toxines présentes dans les régions concernées (cf. ch1.II.7).

En France, la maladie est classée par les professionnels de santé comme TIAC (Toxi-infection alimentaire collective) à ciguatéra. Elle est à ce titre à déclaration obligatoire. L'augmentation du déplacement des personnes et des échanges commerciaux fait naître un problème de diagnostic médical : il n'est en effet pas évident pour les médecins des régions non endémiques et non familiarisés aux intoxications de type ciguatérique d'émettre rapidement un avis médical sur l'étiologie du phénomène (Vaillant *et al.*, 2001 ; Vigneau *et al.*, 2008).

II.3.c.2 La ciguatéra chronique

A la suite d'une première intoxication, certains symptômes (paresthésie ou prurit : persistance des picotements avec démangeaisons palmo-plantaires) peuvent réapparaître ou être exacerbés par la consommation ultérieure de produits marins, d'alcool, de chocolat, de cacahuète, lors d'activités physiques, de relations sexuelles, ou encore lors de changement dans les habitudes alimentaires (CDC, 1998 ; Lewis, 2006). En effet, à l'inverse d'un phénomène d'immunisation, l'organisme semble se sensibiliser : soit par un processus immunologique, soit par accumulation de toxines (Glaziou and Martin, 1993). La biopersistance de certaines toxines peut être plus ou moins longue. Le seuil symptomatique peut être dépassé d'autant plus souvent et/ou facilement que le corps est de nouveau sujet à intoxication. Il est fort probable que ces deux phénomènes soient cumulés. Ce seuil symptomatique est donc fonction de la lenteur de l'élimination des toxines mais aussi de la sensibilité individuelle (Hamilton *et al.*, 2009). Ce phénomène bien connu des populations insulaires est dénommé cliniquement ciguatéra chronique, il peut durer plusieurs mois à

plusieurs années. Les symptômes neurologiques sont des sensations de faiblesse, d'anxiété avec une fatigue persistante alternant avec des insomnies (syndrome de fatigue chronique) qui peuvent être associés à une dépression nerveuse (Pearn, 2001 ; Gatti *et al.*, 2008).

II.3.d Comment soigner la ciguatéra ?

II.3.d.1 Traitement traditionnel

Dans le Pacifique, les populations polynésiennes, mélanésiennes, micronésiennes ou caucasiennes font souvent appel aux guérisseurs locaux pour prévenir ou soigner les cas de ciguatéra ou « gratte ». Ces remèdes traditionnels éprouvés depuis des millénaires sont souvent plus efficaces et surtout plus accessibles dans les zones insulaires, parfois très isolées où sévit fréquemment cette intoxication.



Photos 4, 5, 6 : Plantes utilisées dans les remèdes traditionnels : faux-tabac (*Heliotropium foertherianum*), faux poivrier (*Schinus terebinthifolius*) et vitex (*Vitex trifolia*).

Le faux tabac dit « arbre à gratte » (*Heliotropium foertherianum*, photo 4), le faux-poivrier (*Schinus terebinthifolius*, photo 5) ou encore le vitex (*Vitex trifolia*, photo 6) font partie des nombreuses plantes utilisées traditionnellement pour lutter contre l'intoxication. Les racines, feuilles, écorces ou fruits sont préparés en décoction, en infusion ou macération, pures ou en mélange selon différentes proportions et selon une posologie propre, suivant des « recettes de cuisine » ancestralement transmises de génération en génération en toute discrétion.

En 1990, l'ORSTOM (futur-IRD) a lancé un programme d'étude de ces remèdes (Laurent *et al.*, 1993). Une liste de près de 100 plantes a pu être établie, permettant d'initier un programme ethnopharmacologique avec pour objectif, une meilleure compréhension du phénomène d'intoxication.

Notre équipe de recherche à l'IRD, en collaboration avec l'ILM de Polynésie Française et l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, travaille sur la valorisation de ces remèdes traditionnels dans le but d'identifier les substances bioactives de plantes sélectionnées selon des méthodes ethnopharmacologiques. Ainsi, trois thèses ont été soutenues depuis 2005 apportant de meilleures connaissances sur les mécanismes de l'intoxication (Boydrone-Le Garrec, 2005 ; Kumar-Roiné, 2009 ; Matsui, 2009). Elles ont pu montrer l'efficacité de certains de ces remèdes voire caractériser certains composés bioactifs comme l'acide

rosmarinique, isolé du faux-tabac qui manifeste un effet « détoxifiant » (Boydrone-Le Garrec *et al.*, 2005 ; Matsui *et al.*, 2009 ; Kumar-Roiné *et al.*, 2009). Les recherches continuent dans le but d'optimiser l'utilisation de ces remèdes traditionnels afin de permettre à tous de bénéficier plus facilement des bienfaits de la nature pour vivre avec la ciguatera.

II.3.d.2 Traitement occidental

En l'absence d'antidote, le traitement occidental est symptomatique, utilisant par exemple des antispasmodiques et des antiémétiques pour les symptômes digestifs, des complexes vitaminiques (B1, B6, B12), du gluconate de calcium ou des antihistaminiques pour les symptômes neurologiques. Dans les cas les plus graves pouvant nécessiter une hospitalisation, le D-mannitol, administré précocement en intraveineuse, reste le traitement de référence des formes neurologiques. Le mannitol agirait sur l'interaction des CTXs avec le CSSP de par ses propriétés osmotiques (Blythe *et al.*, 1994 ; Dickey and Plakas, 2010). Dans les formes chroniques, l'amitriptyline et la gabapentine ont été utilisées dans le traitement de la douleur et des paresthésies (Sebat *et al.*, 2004).

Récemment, les recherches menées à l'Université d'Osaka permettent d'apporter un espoir quant au traitement de la ciguatera à l'aide d'anticorps monoclonaux (Inoue *et al.*, 2009). L'étude montre que la fixation de deux anticorps monoclonaux spécifiques de la P-CTX-3C neutralise sa toxicité à la fois *in vitro* (cytotoxicité sur neuroblastomes) et *in vivo* (modèle souris) : « encapsulée », la toxine n'a plus la possibilité de se fixer aux canaux sodiques.

II.4 Aspects socio-économiques

Les intoxications sévissent principalement dans les zones tropicales, là où 10% de la population vit sur la bande côtière. Une grande partie des communautés insulaires dépend économiquement des ressources marines (Dupon, 1993) et se retrouve confrontée à ce phénomène.

II.4.a Impact sur la santé publique et coût

Le caractère sévère de la morbidité est le problème majeur de cette intoxication. En l'absence de traitement, la ciguatera peut être invalidante des jours voire des mois pour certains cas d'intoxications. La maladie représente ainsi un coût non négligeable pour les communautés insulaires ne pouvant plus pêcher et pour les collectivités, lors des soins médicaux. L'arrêt maladie et les frais médicaux coûteraient 1 100 \$ pour une intoxication (Lehane and Lewis, 2000). Ainsi, en 1992, en Nouvelle-Calédonie où il y a eu 192 cas déclarés, les dépenses médicales se seraient élevées à 153 350 €.

Lorsque la ressource pisciaire n'est plus disponible en raison du risque de ciguatera, les populations se tournent davantage vers la consommation de produits de qualité nutritive moindre. Dans certaines îles du Pacifique, on observe alors un phénomène de transition alimentaire forcée avec des conséquences importantes sur la santé humaine (diabète, obésité ...) (Dewailly *et al.*, 2008; Château-Degat *et al.*, 2009).

II.4.b Impact sur l'économie

Le lagon constitue un espace de productivité biologique important et facilement accessible ; peu de moyens sont nécessaires pour l'exploitation de ses ressources dans un but d'autosubsistance ou pour sa valorisation à travers une activité économique (pêche de type artisanal) (David, 1991). Mais dès lors que la ciguatéra impacte la pêche lagunaire, là où potentiellement l'intoxication est la plus probable, les petits pêcheurs se tournent vers la pêche d'espèces du large (poissons pélagiques), ce qui entraîne une augmentation du coût de l'activité (bateau adapté, essence, temps...). Dans certaines régions, l'économie de la pêche lagunaire est également freinée par la réglementation qui interdit à la vente certains poissons dont la probabilité d'être toxique est importante. Elle vise à protéger le consommateur en interdisant ou en limitant la commercialisation des espèces à risque selon le poids et/ou l'origine des spécimens. Mais il est difficile pour ces réglementations d'être en phase avec la réalité scientifique du phénomène, compte tenu de la variabilité avérée de la ciguatéra dans le temps et dans l'espace.

L'activité économique des îles tire profit de leur environnement, deux activités majeures se sont développées autour des zones lagunaires : le tourisme et l'aquaculture, toutes deux plus ou moins importantes. Il peut exister des problèmes de concurrence entre ces deux activités dépendant toutes deux de la santé et de la qualité du lagon. Pendant longtemps, des structures touristiques ont pu s'installer sans se soucier de la dégradation du lagon (constructions, rejets, impact des populations...) et des pratiques de pêche ont entraîné de fortes dégradations du corail (dynamitage, ...). Sans développement raisonnable et réglementations adéquates, ces activités jouent potentiellement un rôle dans le développement de zones ciguatériques (cf. ch1.II.7.d et ch.3.I.1). Ainsi, la dégradation des lagons ou des zones littorales peut, à terme, mettre en péril les activités qui en tirent profit.

II.4.c Evaluation de l'impact économique global des biotoxines marines

Il est difficile d'évaluer l'impact de la ciguatéra sur l'économie d'une collectivité tant les atteintes qui peuvent être directes ou non sont diverses et parfois même difficilement perceptibles. Aussi, afin de disposer d'outils de quantification d'impact notamment pour les pouvoirs publics, Shuval (2001) a développé à la demande de l'Organisme Mondial de la Santé (OMS) un indice, le DALYs pour « Disability-Adjusted Life Years », permettant d'évaluer l'impact économique des biotoxines marines. Cet indice est calculé en prenant en compte différentes échelles : l'homme et ses activités (la personne et sa sensibilité, travail, activité, mortalité), l'environnement (pêcherie, impact récréationnel) et l'économie mondiale. Le DALYs permet d'estimer les pertes économiques liées au phénomène considéré. Celui des biotoxines marines est estimé à 10^6 DALYs / an, soit un impact économique de 4×10^9 \$ / an au niveau mondial.

II.5 Aspects toxicologiques - Les toxines associées au phénomène ciguatérique

Les toxines produites par les dinoflagellés ou les diatomées sont des phycotoxines, tandis que celles produites par les cyanobactéries composent la grande classe des

cyanotoxines. Métabolites secondaires, les toxines seraient synthétisées par les organismes dans un but de protection et pour limiter la prédatation mais leurs rôles ne sont pas encore bien expliqués.

Nous présenterons successivement dans cette partie, les toxines qui sont impliquées de manière formelle dans la ciguatéra (CTXs), les autres toxines produites par le dinoflagellé *Gambierdiscus* (maitotoxines, acides gambiéiques, gambiérol) et celles suspectées de contribuer au phénomène écotoxicologique (acide okadaïque, palytoxine) mais pour lesquelles les preuves de leur implication n'ont pas été apportées de manière irréfutable.

II.5.a Les ciguatoxines

Les ciguatoxines (CTXs) et leurs précurseurs, les gambiertoxines (GTxs), sont synthétisées par les dinoflagellés du genre *Gambierdiscus*. Leur présence dans les chairs de poissons n'entraîne aucune odeur, ni goût particulier. Thermorésistantes, la cuisson ne permet pas de dégrader ces molécules complexes (Pearn, 2001).

Les CTXs sont regroupées en 3 familles selon leur origine géographique : les ciguatoxines du Pacifique (P-CTX), des Caraïbes (C-CTX), et de l'Océan Indien (I-CTX), auxquelles on peut ajouter les toxines produites par les *Gambierdiscus* (Lewis, 2006).

II.5.a.1 Structure chimique

Les CTXS sont de polyéthers polycycliques liposolubles de faible poids moléculaire variant de 1 023 - 1 157 Da. Cette famille de toxines est stable et peut être conservée au moins six mois à -4°C dans un solvant adéquat (méthanol, éthanol...). A ce jour, une cinquantaine de congénères de CTXs a été isolée et caractérisée d'un point de vue chromatographique (figure 8), mais toutes n'ont pas encore été décrites structurellement (Yasumoto, 2001 ; Litaker *et al.*, 2010).

Actuellement, aucune CTX n'est disponible commercialement et seules certaines d'entre elles peuvent être synthétisées entièrement (Hirama *et al.*, 2001) ou partiellement (Kobayashi *et al.*, 2004). La recherche s'appuie donc sur les cultures *in vitro* des microorganismes producteurs de CTXs pour s'approvisionner en précieuses CTXs. Seuls certains laboratoires comme celui des Microalgues Toxiques de l'ILM, maîtrisent suffisamment la culture des *Gambierdiscus*, l'extraction et la purification des CTXs pour proposer des toxines d'une pureté satisfaisante.

Les lignées toxiques de *Gambierdiscus* produisent différentes toxines qui seront biotransformées à chaque maillon de la chaîne trophique et différemment selon les organismes hôtes contaminés (Lewis and Holmes, 1993). Ainsi, à chaque espèce (pisciaire ou autre) et à chaque niveau trophique est associé un profil toxinique propre, complexe et très variable (figure 9). Cette complexité explique en partie les symptômes polymorphes de la ciguatéra.

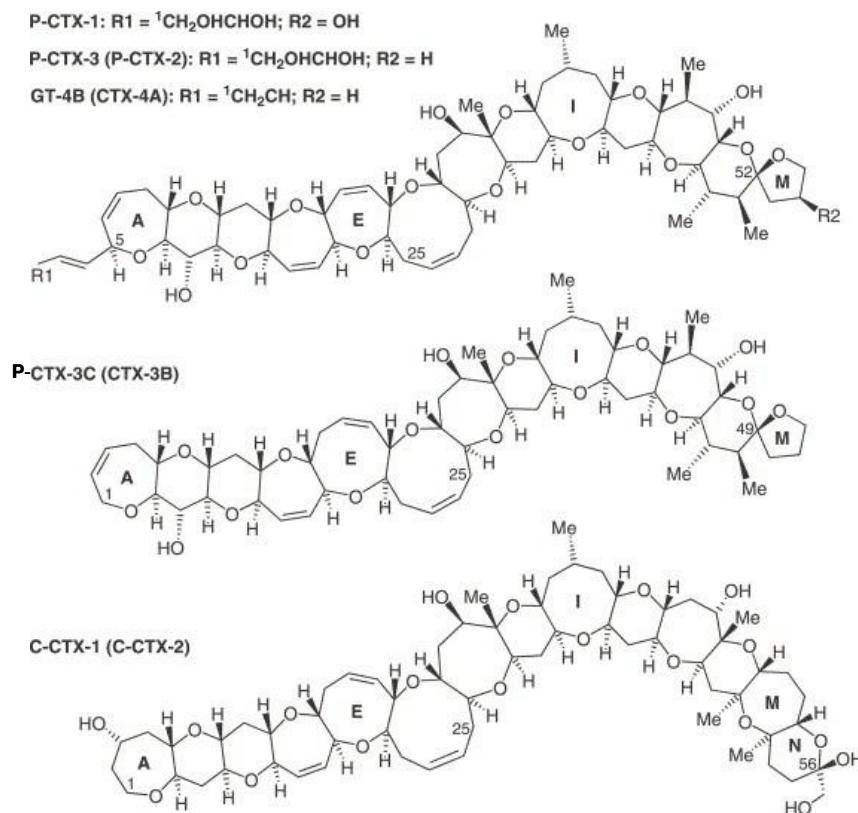


Figure 8: Structure chimique de quelques CTXs (Extrait de Lewis, 2006).

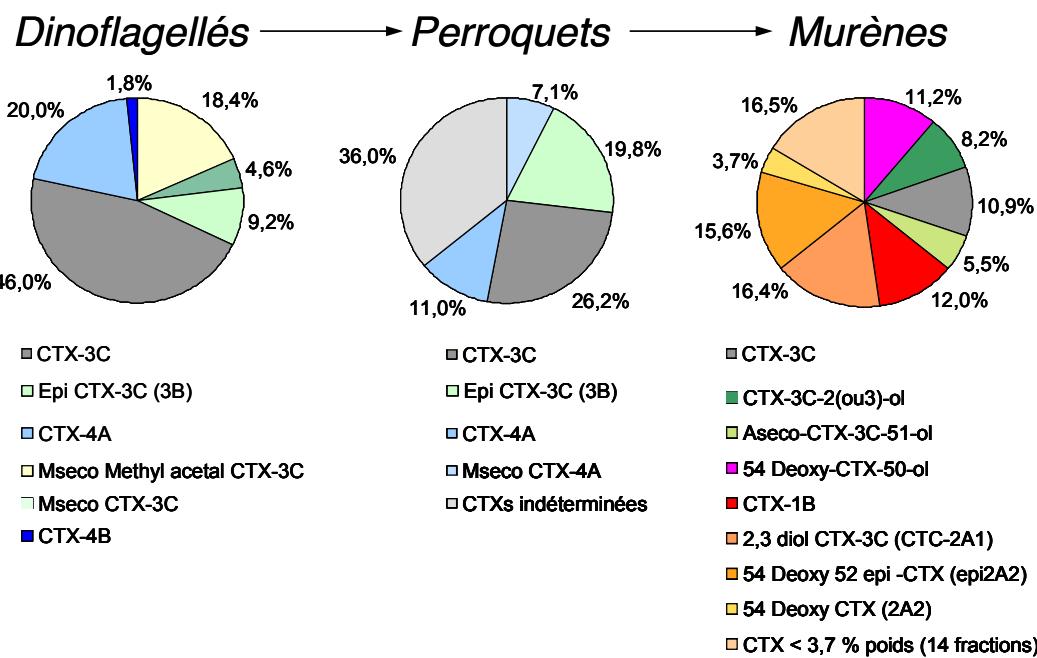


Figure 9: Diversité de profils toxiques dans la chaîne trophique (Source ILM, données non publiées).

II.5.a.2 Cible moléculaire et mécanismes d'action

Les CTXs activent les CSSP, protéines transmembranaires présentes à la surface des cellules excitables (nerveuses musculaires ou myocardiques) ou de certaines cellules non excitables comme les cellules gliales (figure 10). La toxine se fixe spécifiquement au niveau de la sous-unité α du site 5 de la protéine membranaire constituant le canal. Les séquences extracellulaires des segments transmembranaires S6 (domaine I) et S5 (domaine IV) seraient impliquées dans la formation du site fixant la toxine (Bottein-Dechraoui *et al.*, 2005). Les CTXs ayant une forte affinité pour le CSSP, leur fixation est quasi-irréversible (Lewis, 2006 ; tableau 2).

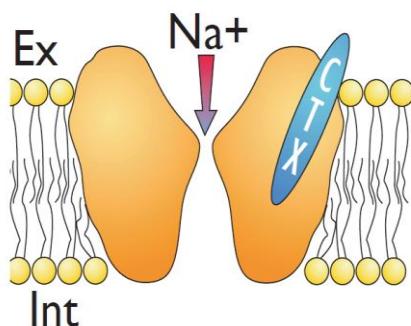


Figure 10: Modèle structural simplifié du canal sodium sensible au potentiel (CSSP).

II.5.a.3 Conséquences de la fixation des CTXs sur les voies métaboliques

La fixation des CTXs sur les CSSP bloque ceux-ci en position ouverte. Il en résulte : (i) une augmentation de la perméabilité membranaire au sodium, (ii) une augmentation de l'excitabilité membranaire qui correspond à la dépolarisation de la membrane, (iii) une altération de la libération des neurotransmetteurs et enfin (iv) une augmentation du volume cellulaire par entrée d'eau. L'ensemble de ces modifications a différentes répercussions en fonction du type de cellules cibles : perturbation de l'influx nerveux (cellules nerveuses), perturbation de l'activité musculaire (cellules musculaires), des effets biphasiques (cellules cardiaques) ou encore des libérations de neurotransmetteurs (au niveau des jonctions cellulaires).

Même si le mode d'action est en grande partie déterminé, les conséquences sur le métabolisme secondaire ne sont pas complètement élucidées notamment en ce qui concerne l'immunotoxicité. Récemment, il a été mis en évidence l'induction de l'oxyde nitrique (NO) dans la cascade métabolique provoquée par l'action des CTXs (Kumar-Roiné *et al.*, 2008). L'implication de ce radical NO expliquerait le polymorphisme de l'intoxication ciguatérique. L'étude des mécanismes de toxicité permet une meilleure compréhension d'un point de vue biologique et physiologique en général, permettant ainsi de mieux évaluer les bases d'un traitement médical.

II.5.a.4 Potentiel toxique

L'oxydation des congénères de CTXs confère à chaque degré une augmentation de la toxicité de la toxine (Murata *et al.*, 1989; Lewis and Holmes, 1993). Le tableau 2 synthétise les potentiels toxiques selon divers tests présentés par la suite (cf. ch.1.II.6.b et ch.2.II.2.d). La P-CTX-1B, la forme la plus oxydée car en fin de chaîne alimentaire, est la plus toxique des congénères (Lewis *et al.*, 1991). Elle entraîne des risques pour la santé humaine à des concentrations de 0,1 ppb soit 0,1 µg de P-CTX-1B / kg de chair (Pearn, 2001 ; Lewis *et al.*, 2009).

Tableau 2 : Caractéristiques et potentiels toxiques de quelques CTXs (d'après Lehane and Lewis, 2000 ; Lewis, 2006 ; Dechraoui, 1999 ; Bottein-Dechraoui *et al.*, 2005) ; ⁽¹⁾Test RBA : test de fixation spécifique sur synaptosomes de cerveaux de rat et ⁽²⁾Test N2A : test de cytotoxicité sur cellules de neuroblastomes (Neuro-2A), i.p. : injection intrapéritonéale.

Ciguatoxine	Caractéristiques			Toxicité		
	Origine	Masse moléculaire [M+H]	Référence	Test souris	Test RBA ⁽¹⁾	Test N2A ⁽²⁾
				DL ₅₀ (i.p.) µg / kg	Ki nM	CI ₅₀ nM
P-CTX-1	<i>Poisson carnivore</i>	1111	Murata <i>et al.</i> , 1991	0,25	0,041	11,3
P-CTX-2 A2	<i>Poisson carnivore</i>	1095	Lewis <i>et al.</i> , 1991	2,3 (PCTX-2)	0,047	86
P-CTX-3	<i>Poisson carnivore</i>	1095	Lewis <i>et al.</i> , 1991	0,9	-	-
P-CTX-3C	<i>Gambierdiscus</i>	1045	Satake <i>et al.</i> , 1993	2	0,49	146
2,3-DihydroxyP-CTX-3C	<i>Poisson carnivore</i>	1057	Satake <i>et al.</i> , 1998	1,8	-	-
51-HydroxyP-CTX-3C	<i>Poisson carnivore</i>	1039	Satake <i>et al.</i> , 1998	0,27	-	-
P-CTX-4A	<i>G. toxicus</i> <i>Poisson herbivore</i>	1061	Satake <i>et al.</i> , 1997	2	0,93	
P-CTX-4B	<i>G. toxicus</i> <i>Poisson herbivore</i>	1061	Murata <i>et al.</i> , 1991	4	-	-
C-CTX-1	<i>Poisson carnivore</i>	1141	Vernoux et Lewis, 1997	3,6	-	-
C-CTX-2	<i>Poisson carnivore</i>	1141	Vernoux et Lewis, 1997	1	-	-
I-CTX-1	<i>Poisson carnivore</i>	1141	Hamilton <i>et al.</i> , 2002	0,5	-	-
I-CTX-2	<i>Poisson carnivore</i>	1141	Hamilton <i>et al.</i> , 2002	0,5	-	-

II.5.b Les maitotoxines

II.5.b.1 Généralités

Les maitotoxines (MTXs) sont des neurotoxines extrêmement puissantes qui tirent leur nom du *maito*, nom tahitien du poisson chirurgien *Ctenochaetus striatus* dont le premier type, MTX-1, a été isolé par Yasumoto *et al.* (1987). Ce sont des polyéthers polycycliques sulfatés comportant 32 cycles. Trois congénères ont été isolés MTX-1 à MTX-3 respectivement de poids moléculaire 3 422, 3 298 et 1 060 Da (Murata *et al.*, 1992 ; Murata *et al.*, 1993 ; Caillaud *et al.*, 2010). Seule la structure de la MTX-1 a été déterminée ($C_{164}H_{256}O_{68}S_2Na_2$) (Yasumoto *et al.*, 2001 ; Lewis, 2006) (figure 11).

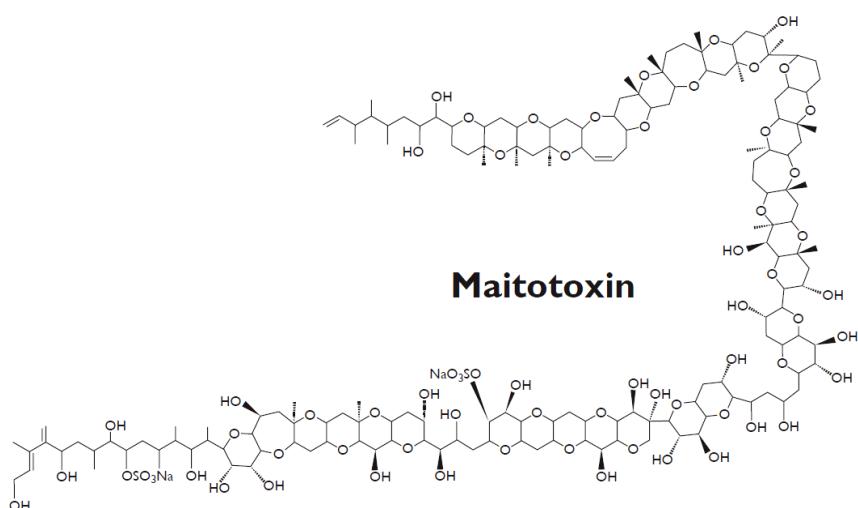


Figure 11: Structure de la MTX-1.

II.5.b.2 Mécanismes d'action

Les MTXs activent les canaux calciques des cellules (sensibles ou non au potentiel), engendrant une augmentation de la perméabilité membranaire aux ions calcium (Ca^{2+}) (Ohizumi, 1987 ; Lewis *et al.*, 2000 ; de la Rosa *et al.*, 2007). Elles provoquent une plasmolyse des cellules par une accumulation lente et progressive de Ca^{2+} intracellulaire. Les MTXs provoquent des effets hémolytiques, ichtyotoxiques et cytotoxiques. Leurs mécanismes d'action restent toutefois encore mal définis (Ohizumi, 1987 ; Yasumoto *et al.*, 2001).

II.5.b.3 Toxicité

Les MTXs sont parmi les composés naturels les plus toxiques dans la nature. Injectée en i.p., la dose létale chez la souris est de 50 ng / kg, bien plus毒ique que la P-CTX-1 (0,25 µg / kg en i.p., tableau 2), mais elle est 100 fois moins toxique administrée par voie orale (Yokohama *et al.*, 1988 ; Satake *et al.*, 2007). En outre, de par sa polarité, elle ne s'accumule pas dans les chairs du poisson ; les MTXs n'interviennent donc généralement pas dans le phénomène de la ciguatera (Lewis and Holmes, 1993 ; Lewis, *et al.*, 2000). En revanche, elles peuvent engendrer une forte toxicité si celles-ci sont encore présentes dans le tractus

digestif du poisson (Bagnis *et al.*, 1992), en particulier dans les régions à forte prévalence de ciguatéra où les insulaires ont coutume de consommer également la tête et les viscères de poissons.

II.5.c Les acides gambiéiques et le gambiérol

Les acides gambiéiques et le gambiérol sont des composés extraits de *Gambierdiscus toxicus* (Moroashi *et al.*, 1998 ; Morohashi *et al.*, 2000 ; Yasumoto *et al.*, 2005). Leurs mécanismes d'action ne sont pas encore complètement élucidés ; leurs cibles pharmacologiques sont les canaux Na^+ pour les acides gambiéiques et les canaux Na^+ , K^+ et TRPV1 (canaux cationiques non spécifiques impliqués dans la sensibilité aux température et dans les réactions aux brûlures) pour le gambiérol (Inoue *et al.*, 2003 ; Cuypers *et al.*, 2007 ; 2008).

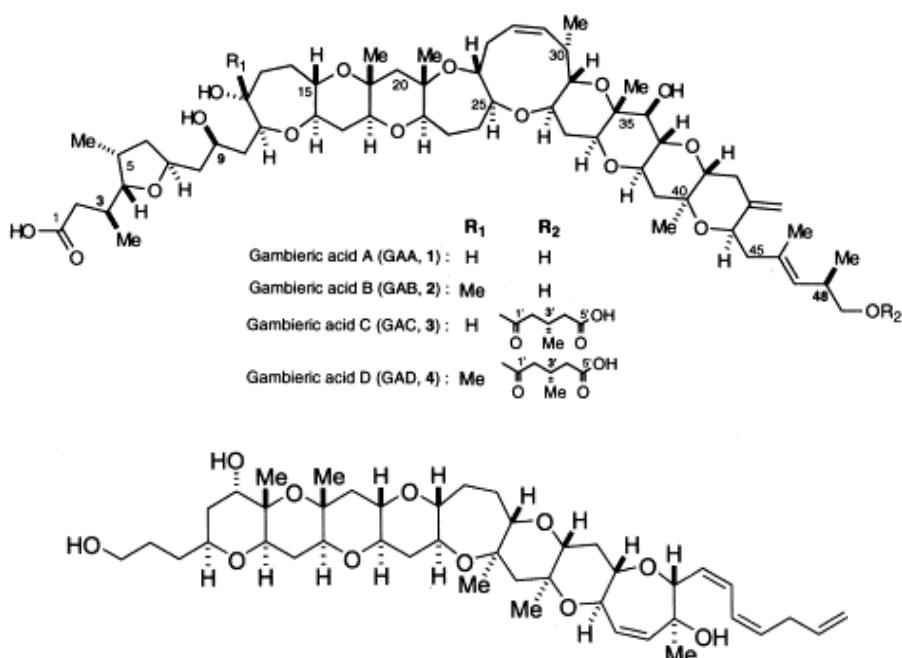


Figure 12 : Structure chimique des acides gambiéiques (Morohashi *et al.*, 2000) et du gambiérol (Ito *et al.*, 2003).

Ces composés liposolubles sont structurellement proches (figure 12) et provoquent le même type de symptômes que ceux de la ciguatéra en injection intra-péritonéale (i.p.) chez la souris (Ito *et al.*, 2003). Certaines études avancent donc l'hypothèse de leur rôle dans les intoxications ciguatériques mais celui-ci reste encore à confirmer (Ito *et al.*, 2003 ; Cuypers *et al.*, 2008).

II.5.d L'acide okadaïque

II.5.d.1 Description et action

L'acide okadaïque (AO) et ses dérivés, les dinophysitoxines (DTXs-1, -2, -3, -4) sont responsables des IDFM (cf. ch.1.I.b). Elles font parties de la classe des toxines polyéthérées lipophiles (Van Dolah, 2000 ; Château-Degat, 2003). Ces toxines inhibent l'action des

protéines phosphatases (PP1 et PP2A), enzymes provoquant la déphosphorylation de certaines protéines. L'accumulation de protéines phosphorylées induit des contractions musculaires. Elles agissent sur la perméabilité des vaisseaux du tube digestif ce qui explique les symptômes majoritairement d'ordre gastrique. La dose létale de l'AO injectée en i.p. chez la souris est de 192 µg / kg (Frémy et Lassus, 2001).

II.5.d.2 Lien avec la ciguatéra

Plusieurs études mettent en évidence l'implication possible de l'AO et de ses congénères dans des intoxications de type ciguatérique. Isolées et identifiées à partir d'extraits d'éponge *Halichondria okadaï*, l'AO et les DTXs sont synthétisés par les dinoflagellés du genre *Prorocentrum* ou *Dinophysis* souvent associés aux mêmes biotopes que *Gambierdiscus* (Dickey *et al.*, 1990 ; Ten-Hage *et al.*, 2000). Elles pourraient donc jouer un rôle dans les intoxications ciguatériques, mais nous ne disposons pas d'étude scientifique apportant les preuves formelles de leur implication.

II.5.e La palytoxine

La palytoxine (PTX) est une macromolécule complexe possédant à la fois une partie hydrosoluble et liposoluble. A ce jour, c'est le composé naturel non protéinique le plus毒ique (Katikou, 2007). Impliquée dans les cas de clupéotoxisme (cf. ch.1.I.2.c), elle serait principalement synthétisée par différentes espèces du genre *Ostreopsis*, dinoflagellé benthique se développant dans les mêmes biotopes que *Gambierdiscus* (cf. ch.1.II.7.a) (Katikou, 2007).

II.5.e.1 Description et mécanisme d'actions

La PTX est polyhydroxylée, de poids moléculaire de 2 680 Da et de formule chimique C₁₂₉H₂₂₃N₃O₅₄ (figure 3c) (Katikou, 2007). Elle fut découverte à la suite d'études sur une intoxication déclarée ciguatérique. En 1971, des chercheurs d'Hawaii l'ont isolé de *Palythoa toxica*, corail mou de la famille des Zoanthidae. Par la suite, des équipes japonaises d'Okinawa ont isolé du contenu digestif de balistes ayant causé la mort de cochons, des composées similaires à la PTX (PTX-like) (Tan and Lau, 2000). Nombreux sont les organismes récifaux capables de séquestrer la PTX : crustacés, moules, éponges (*Porifera* sp.), coraux mous (*Alcyonaria*), poissons (*Chaetodon* sp.), étoiles de mer (*Acanthaster*) (Gleibs and Mebs, 1999 ; Wu, 2009).

La PTX possède un large éventail d'action : (i) elle agit sur la pompe protéique Na⁺/K⁺, la bloquant en position ouverte et induisant un efflux K⁺ et un influx Na⁺, ce qui entraîne une perturbation du gradient ionique et une dépolarisation des membranes excitables, (ii) elle induit une activation secondaire des canaux Ca²⁺ et (iii) augmente la libération des neuromédiateurs au niveau des terminaisons nerveuses (Vale and Ares, 2007). Les conséquences de l'action de cette neurotoxine sont de sévères contractions musculaires, des irritations cutanées, de la fièvre et une gêne respiratoire (cf. ch.1.II.c sur le clupéotoxisme).

II.5.e.2 Lien avec la ciguatera

En 1986, à Hawaii, la palytoxine (PTX) a causé des intoxications de type ciguatérique par ingestion de maquereaux (*Decapterus macromos*a) (Kodama *et al.*, 1989). La symptomatologie observée était similaire au tableau clinique ciguatérique avec toutefois une particularité : le syndrome « spinal-seizure » observé 48 h après les premiers symptômes et associé à de fortes contractions musculaires (Kodama *et al.*, 1989 ; Tan *et al.*, 2000). L'association de cette toxine avec les CTXs pourrait engendrer des intoxications à caractère ciguatérique atypique (cf. ch.2.III).

II.6 Détection des organismes toxiques

Une des principales demandes des consommateurs de poissons tropicaux et particulièrement des populations insulaires, porte sur la disponibilité d'un test de détection des poissons toxiques. Les questions qui se posaient en 1961, relevées par Banner, sont toujours d'actualité : « Les habitants des îles nous posent toujours les mêmes questions : Quels sont les poissons qui ne présentent aucun danger? Comment peut-on déterminer si un poisson est toxique ou non? » (Banner, 1961). Car rien ne permet de discriminer un poisson sain d'un individu toxique (ni l'odeur, la couleur ou le goût). A ce jour, il n'existe aucun test pour les particuliers totalement fiable sur le marché. Ainsi, la mise en place d'un test de référence à la fois sensible, simple, rapide, fiable, utilisable sur le terrain et peu onéreux demeure actuellement un des principaux enjeux actuels pour la communauté de chercheurs spécialisés dans le domaine.

Les principaux obstacles à la détection des CTXs sont (i) les faibles quantités de toxines à détecter dans les matrices contaminées de l'ordre de 0,1 ppb, et (ii) la multiplicité des toxines en jeu avec des structures et des degrés de toxicité très variables. La faible disponibilité en toxines pures est le facteur limitant pour l'avancée des recherches. Malgré ces contraintes, différentes méthodes d'évaluation de la ciguatoxicité ont été développées avec plus ou moins d'efficacité. Actuellement, les progrès de la recherche ont permis la mise en place de tests utilisables en routine au laboratoire, incluant à la fois des tests *in vivo* (test sur animaux) et *in vitro* (méthodes chimiques, neuro-pharmacologiques, immuno-chimiques et tests de cytotoxicité).

Dans cette partie, après une présentation succincte de quelques tests basés sur les croyances populaires, nous ferons le point sur l'avancée des tests de laboratoire utilisés pour la détection des CTXs, en soulignant les avantages, sensibilité et spécificité et les inconvénients. La sensibilité traduit la probabilité pour un poisson toxique de donner un résultat positif. La spécificité, quant à elle, traduit la probabilité pour un poisson non toxique de donner un résultat négatif.

II.6.a Tests traditionnels

Bien avant que les scientifiques ne se penchent sur le phénomène ciguatérique, les populations insulaires étaient déjà confrontées à la ciguatoxicité des poissons récifaux. Tout naturellement, au fil des âges, ils ont ainsi développé un certain nombre de tests empiriques

leur permettant d'éviter les poissons suspects et les zones dites « à risque » (Chilshom, 1808).

Les tests sur insectes (fourmis, mouches ou autres) sont basés sur leur répulsion vis-à-vis de la chair ou des viscères d'un poisson contaminé (Pichon et Bagnis, 1973). Quant au test dit « du chat », si après ingestion d'un morceau de chair de poisson, l'animal ne présente aucun symptôme d'intoxication typique (faiblesse, vomissement, troubles de la coordination ou mort), le poisson entier pourra alors être consommé. Dans certaines îles du Pacifique, ces tests sont également pratiqués sur les poulets, les canards, les tortues ou encore les chiens du village, si plus aucun chat (animal considéré comme le plus sensible aux toxines ciguatériques) n'est encore vivant.

Les métaux sont également utilisés avec le test à la pièce d'argent : une pièce ou une cuillère en argent est mise à bouillir en présence de chair suspecte. Le métal ressort terni si celle-ci est毒ique. Des fils de cuivre noirciraient également avec ce même traitement si la chair est毒ique (Boydrone, 2004). L'équipe hawaïenne de Banner a montré qu'aucun de ces tests ne s'est révélé fiable lors d'essais en laboratoire (Banner *et al.*, 1963).

Enfin, le « test du foie » utilise la sensibilité accrue de certaines personnes vis-à-vis des intoxications ciguatériques. A cet effet, le foie de poisson, qui héberge les plus fortes concentrations de toxines, sera mis au contact de la langue ou des lèvres de personnes ayant déjà été atteintes d'intoxications ciguatériques. L'hypersensibilité acquise leur permettrait de sentir des picotements si le foie est contaminé. Cette technique qui dépend de nombreux facteurs (sensibilité propre de la personne, capacité du poisson à la compartmentation différentielle, ...) ne peut s'avérer fiable et aucune équipe scientifique ne s'est aventurée à valider ce test à travers une étude à grande échelle.

Actuellement, l'équipe du Laboratoire des Microalgues Toxiques de l'ILM, en collaboration avec l'IRD et l'Université de Laval (Québec, Canada), achève une étude visant à valider scientifiquement deux tests utilisés traditionnellement par la population de Raivavae (Australes, Polynésie Française) : observation de la rigidité cadavérique et/ou de signes d'hémorragie après incision à la base de la queue des poissons. Une centaine de poissons, prélevés dans le cadre du suivi du risque ciguatérique du lagon de Raivavae, a ainsi été passée au crible de ces deux tests populaires avant d'être analysés en laboratoire par le test RBA (tableau 2).

II.6.b Tests de laboratoire

Plusieurs méthodes de détection ont été mises en place depuis le début des années 50. Certaines ont été largement utilisées puis progressivement abandonnées pour laisser place à de nouveaux tests, plus spécifiques et plus sensibles, développés au fur et à mesure des connaissances acquises sur la structure des CTXs et leurs mécanismes d'action. Ces différentes méthodes sont basées soit sur le mode d'action des toxines, soit sur leurs propriétés structurales.

II.6.b.1 Méthodes analytiques basées sur le mode d'action des CTXs

II.6.b.1.a Tests *in vivo*

Historiquement, ce sont les premiers tests utilisés pour mettre en évidence l'effet des CTXs. Différents modèles de laboratoire ont été proposés qui utilisent des vertébrés ou des invertébrés. L'intoxication de l'animal intervient soit par gavage, soit par injection i.p. ou intraveineuse (i.v.). Afin d'évaluer l'efficacité du test, plusieurs critères sont pris en compte : la sensibilité de l'espèce, la spécificité des symptômes, la quantification de la réponse de l'animal en termes de toxicité, la possibilité d'utiliser le test en routine et enfin le caractère éthique du test. Ces tests biologiques donnent une réponse globale de la toxicité d'un extrait brut. Le test souris est le plus utilisé pour les études de toxicité aiguë. Le tableau 3 résume les différents bioessais utilisés en présentant le principe, les seuils de sensibilité et leurs avantages et inconvénients.

Ces bioessais ont été pour la plupart abandonnés, essentiellement pour des raisons d'éthique, de manque de sensibilité, de fiabilité ou de coût. Bien que permettant d'évaluer une toxicité globale, ils ne donnent en revanche aucune information sur la composition toxinique des extraits testés. Utilisés durant plus de 40 ans, ils ont cependant permis de riches avancées dans la compréhension du phénomène de la ciguatera. Mais rapidement, il s'est avéré nécessaire de développer des méthodes de détection alternatives permettant de caractériser les profils toxiniques des échantillons testés.

Tableau 3 : Caractéristiques des tests *in vivo* utilisés dans la détection de la ciguatoxicité (d'après Boydron *et al.*, 2004) ; *US : unité souris (Legrand *et al.*, 1982) : quantité d'extrait nécessaire pour tuer « 1g » de souris en 24 h, **DL₅₀ : quantité d'extrait nécessaire pour tuer 50% du modèle, ***DLM: Dose létale minimum, quantité d'extrait la plus faible pour tuer le modèle, LD : limite de détection.

Test	Principe	Sensibilité et Spécificité	Avantages	Inconvénients	Références
Souris	Injection i.p. de l'extrait Toxicité exprimée en US* (courbe dose / temps de survie) en DL ₅₀ **, ou en DLM***	DLM < 40 g de chair/20 g de souris LD = 1,8 ppb pour la C-CTX-1 LD ₅₀ = 0,25 à 2,3 mg/kg de chair	S'applique à diverses matrices biologiques Peu sensible aux matrices complexes	Moins sensible que les tests <i>in vitro</i> Consommateur d'extrait Ethique	Pottier et Vernoux, 2003 Vernoux, 1994
Chat	Gavage de 10% du poids Observations comportementales : types, heures, intensité (48 h)	150 fois plus sensible que la souris	Sensibilité	Réflexe de vomissement Consommation d'extrait Ethique Economique (disponibilité des chats)	Bagnis et Vernoux, 1975 Bagnis, 1977 Bagnis <i>et al.</i> , 1985
Poussin	Injection par voie i.p. ou i.v. (sous l'aile) ou par gavage (10% du poids) Observations comportementales : types, heures, intensité (48 h)	Plus sensible que la souris, proche de celle du chat (i.p.)	<i>Per os</i> , simplicité de la préparation des extraits (utilisation en routine)	Ethique	Pottier et Vernoux, 2003
Moustique	Test en bio-expérimentation Injection intra thoracique Mortalité observée dans l'heure	DL ₅₀ < 2,25 mg de chair / g d'insecte	Consommation réduite d'extrait Bonne reproductibilité Rapidité	Technicité du test Maîtrise de l'élevage	Chungue <i>et al.</i> , 1984 Pompon <i>et al.</i> , 1984 Bagnis <i>et al.</i> , 1985
Larve de Diptères	Observation de l'effet de 5 g de chair sur la croissance de 10 larves	LD = 0,05-0,3 ng de CTX/ g de chair	Simple et Sensible Pas de problème éthique Bonne corrélation avec le test souris s	Problème de linéarité de la réponse Non spécifique pour les CTXs (très sensible pour l'AO)	Pichon <i>et al.</i> , 1973 Labrousse et Matile, 1996
Mangouste	Administration par voie orale 10% de son poids en poisson Observations comportementales : types, heures, intensité (48 h)		Régurgitation rare	Ethique Consommation d'extrait	Banner <i>et al.</i> , 1961
Ecrevisse	Injection en intramusculaire 0,33% du poids			Faux positifs	Banner <i>et al.</i> , 1967
Larve de crevette	<i>Artemia salina</i> Mesure la mortalité larvaire – 24 h			Invalidé Faux positifs	Boydron, 2004

II.6.b.1.b Le test N2A : Test de cytotoxicité sur neuroblastomes

Le principe du test N2A est basé sur la capacité des CTXs à se fixer spécifiquement sur le site 5 des CSSP (Kogure *et al.*, 1988 ; Manger *et al.*, 1993 ; 1995). Il permet un dosage global des composés cytotoxiques présents dans diverses matrices (ex. chairs ou foies de poissons, bénitiers) avec une sensibilité de l'ordre du nM. Ce test, utilisé comme base du dosage de la toxicité des organismes étudiés dans cette thèse, sera plus largement développé dans la partie « Matériels et Méthodes » du chapitre 2 (cf. ch.2.II.2.d.3). Les principaux avantages et inconvénients de ce test sont :

- Une bonne sensibilité (de l'ordre du nM) (Manger *et al.*, 1993 ; Bottein-Dechraoui *et al.*, 2005),
- Une faible consommation d'extrait (ex : 5 g de chair de poisson),
- Une bonne tolérance aux matrices complexes ne nécessitant au préalable qu'un protocole d'extraction simple (Manger *et al.*, 1995),
- Une automatisation possible avec l'utilisation du format microplaqué,
- Une simplicité dans la lecture des résultats,

- Une durée totale d'analyse relativement longue (42 - 45 h) (sans prise en compte du temps d'extraction de l'échantillon),
- Pas de discrimination entre les toxines activant les CSSP (CTXs ou PbTx),
- Un niveau de technicité élevé (culture cellulaire - manipulation de toxines - formation de l'opérateur)
- Les difficultés d'approvisionnement en toxines spécifiques (e.g. ouabaïne et vératridine) pour les collectivités d'outre-mer.

II.6.b.1.c Le test RBA : test de fixation spécifique sur synaptosomes de rat

Le test de fixation spécifique sur synaptosomes de rat ou *Receptor Binding Assay* (RBA) est un test neuropharmacologique basé sur l'affinité des toxines marines pour le site 5 du CSSP (Poli *et al.*, 1986; Lombet *et al.*, 1987 ; Van Dolah *et al.*, 1994). Ce test dose de manière indirecte la compétition pour le site 5 du CSSP entre le ligand radiomarqué (brévétoxine tritiée ou ^3H -PbTx-3) et l'analyte (CTXs contenues dans l'échantillon). La finalité est de détecter et de doser les CTXs dans les matrices organiques. La figure 13 illustre la courbe de régression classiquement observée permettant d'évaluer la toxicité d'une toxine (ex. de la C-CTX-1) ou d'un extrait. Ce test, également utilisé dans le cadre de cette thèse, sera développé en détail dans le chapitre 2 (cf. ch.2.II.2.d.4).

Le test RBA est actuellement utilisé en routine pour des études environnementales et la surveillance sanitaire des zones à risque de ciguatéra (Bottein-Dechraoui *et al.*, 2005 ; Darius *et al.*, 2007 ; Chinain *et al.*, 2009a) ou dans le cadre de la caractérisation de composés issus de la pharmacopée traditionnelle et actifs dans le traitement de la ciguatéra (Kumar-Roiné, 2009). Il présente certains avantages et inconvénients:

- Une bonne sensibilité, de l'ordre du nM : sensiblement équivalente à celle du test N2A et 10 000 fois supérieure à celle du test souris (Hamilton *et al.*, 2002),

- Une haute spécificité : une détection des composés agissant sur site 5 du CSSP,
- Une bonne tolérance aux matrices complexes : utilisable sur des échantillons partiellement purifiés,
- Possibilité de surévaluer la toxicité (e.g. celle de métabolites autres que les CTXs présentant également une très haute affinité avec les CSSP et donc capables de déplacer la $^3\text{H-PbTx-3}$),
- Fortes contraintes en termes de technicité,
- Préparation des synaptosomes à partir de tissu animalier,
- Manipulation de radioéléments (utilisation de matériel adapté, formation réglementaire des manipulateurs, gestion des déchets...),
- Coûts des réactifs ($^3\text{H-PbTx-3}$).

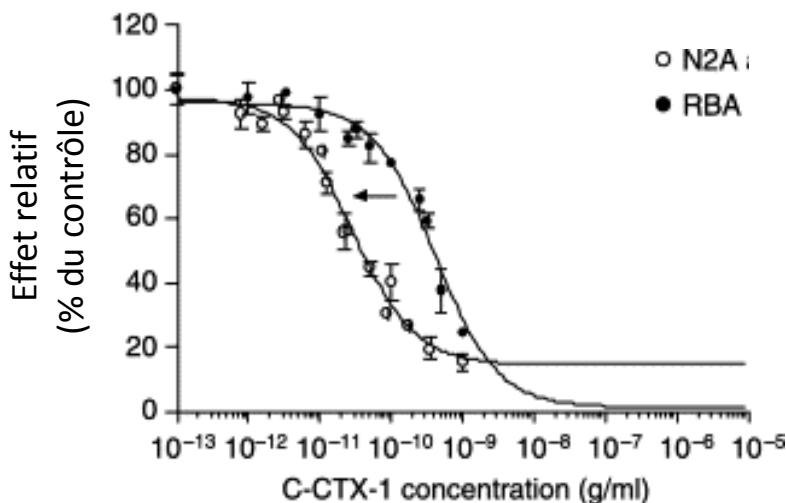


Figure 13 : Courbes de régression sigmoidale de la C-CTX-1 obtenues par le test N2A (○) et le test RBA (●) (extrait de Bottein-Dechraoui *et al.*, 2005).

II.6.b.2 Méthodes analytiques basées sur les propriétés structurales des CTXs

II.6.b.2.a Tests immuno-chimiques

Le principe de ces tests est basé sur une détection d'antigène (CTXs) au moyen d'anticorps (anti-CTXs) polyclonaux ou monoclonaux (Hokama *et al.*, 1977). Les CTXs de faible poids moléculaire sont considérées d'un point de vue immunologique comme des haptènes qui, sans activation préalable puis couplage à une protéine, sont non-immunogènes. Ces haptènes peuvent être activés par une réaction de type chimie micellaire en phase inverse puis couplés à une protéine comme la Bovine Serum Albumine (BSA) (Pauillac *et al.*, 1998). Les conjugués de type CTX-BSA immunogènes sont ensuite injectés *in vivo* à des lapins ou des rats, pour déclencher une réponse immunologique par production d'anticorps spécifiques.

Un marquage de ces conjugués est nécessaire pour visualiser et quantifier les CTXs marqués. Il existe ainsi différents « systèmes rapporteurs » qui par liaison covalente se fixent à l'anticorps sans affecter les propriétés d'aucune des parties. Plusieurs méthodes ont été

développées avec plus ou moins de fiabilité : (i) les méthodes radio-immunologiques utilisant l'iode radioactive (^{125}I) (Laigret *et al.*, 1981), (ii) la méthode d'immunofluorescence utilisant un fluorochrome (Ito *et al.*, 1983) ou (iii) encore les méthodes immuno-enzymatiques couplant l'anticorps à une enzyme (ELISA pour Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) (Hokama *et al.*, 1977 ; Pauillac *et al.*, 2000). Ce test de haute sensibilité permet de doser des CTXs de l'ordre du pg dans les chairs de poissons.

Cette technique de dosage a été utilisée dans de nombreuses études environnementales dans les îles du Pacifique (Wong *et al.*, 2005 ; 2006 ; Ito *et al.*, 1983) et a permis la mise sur le marché des premiers tests utilisables par les pêcheurs (Ciguatect®, Ciguacheck®) basés sur un anticorps monoclonal anti-CTX-1 (Hokama *et al.*, 1998). Cependant, la spécificité du test s'est avérée imparfaite avec l'observation de faux positifs (engendrant un manque à gagner en raison du retrait à la vente de certains poissons pourtant sains, avec un impact non négligeable sur la faune pisciaire en raison d'une pêche excessive) mais également de faux négatifs (risque pour le consommateur) (Dickey *et al.*, 1994). Ce test, malgré les difficultés de mise au point, demeure une voix prometteuse pour l'obtention d'un test de détection de terrain (Naar, 1999).

II.6.b.2.b Tests physico-chimiques

Les techniques de chromatographie liquide (LC) ou gazeuse (GC) couplées à une détection par spectrométrie de masse (MS) simple ou en tandem (MS / MS) permettent non seulement une détection et une quantification spécifique et précise des phycotoxines, mais également l'identification de composés avec une grande sensibilité et sélectivité (Lewis *et al.*, 1998 ; Lewis *et al.*, 2009). Les CTXs peuvent ainsi être séparées et caractérisées en fonction de leurs propriétés structurales. Leur présence peut être confirmée dans des échantillons issus de matrices complexes dont le profil toxinique peut ainsi être établi. En phase inverse LC-MS/MS, elles permettent de détecter dans des chairs de poissons un équivalent de 40 ppt de P-CTX-1 soit 40 ng / kg de chair (Lewis *et al.*, 1998).

La LC-MS/MS permet également l'identification de nouvelles toxines grâce aux différentes informations structurales acquises. Elle présente cependant différentes contraintes :

- Nécessité d'une purification poussée de l'extrait : un prétraitement par dérivation en pré-colonne,
- La nécessité de disposer de toxines pures (standards de référence) pour la détection et la quantification des toxines impliquées.

II.6.c Critères de choix d'un test

Le choix d'un test sera essentiellement dicté par les objectifs de l'étude et de ses paramètres : matrices à tester, toxines et panel des congénères à identifier, seuil de sensibilité exigé ou souhaité, etc... . Le tableau 4 donne une synthèse des critères à considérer lors du choix d'un test de détection.

Tableau 4 : Avantages et spécificités de quelques techniques d'analyses des phycotoxines (d'après Frémy et Lassus, 2001) ; + : Faible ; ++ : moyen ; +++ : élevé ; * : temps de manipulation et temps d'observation.

Techniques	Spécificité	Precision	Sensibilité	Temps d'analyse	Coût	Niveau d'équipement	Praticabilité	Avantages	Contraintes
Bioessais sur animaux	+	+	+	3-48 h*	+	+	+++	Toxicité globale Rapidité	Ethique Animalerie
Test N2A	++	++	++	4-42 h*	++	++	++	Toxicité globale Sensibilité	
Test RBA	+++	++	++	4-24 h*	+++	+++	+++	Toxicité globale Sensibilité	Radiomarquage
Tests immunologiques	+++	++	+++	2 h	++	++	+++	Sensibilité Spécificité	
Chromatographiques	+++	+++	+++	6 h	+++	+++	+	Spécificité	Coût Appareillage

Le choix d'un test dépend de la sensibilité et de sa spécificité mais doit également tenir compte des contraintes techniques (coût du matériel) et humaines (niveau de technicité requis) du laboratoire (notion de praticabilité).

Frémy et Lassus (2001) distingue ainsi trois classes de méthodes regroupant :

- les outils de dépistage, pour les laboratoires impliqués dans la détection en routine de classes de toxines spécifiques (e.g. tests sur animaux, tests de cytotoxicité, tests biochimiques ou immunochimiques)
- les outils d'investigation, pour les laboratoires de recherche (e.g. techniques chromatographiques ou électrophorèse capillaire)
- les outils de confirmation, pour les laboratoires de recherche spécialisés dans la détection de certaines toxines (e.g. spectrométrie de masse).

Enfin, il faut être vigilant quant à la comparaison des résultats, quelque soit le test considéré. Par ailleurs, certains des tests sont sensibles aux matrices complexes et ne peuvent être appliqués qu'à des matrice ayant subi des étapes d'extraction et purification poussées.

Jusqu'à très récemment, le test biologique sur souris était le plus utilisé au sein de l'Union Européenne tant pour la détection des CTXs que pour les toxines diarrhéiques ou paralysantes. Toutefois, depuis 2010, l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) recommande que le test souris soit désormais systématiquement associé à des analyses en LC-MS/MS pour la détection des biotoxines marines lipophiles (Krys *et al.*, 2010).

II.7 Aspects écologiques : l'étiologie du phénomène

II.7.a Organismes ciguatoxinogènes

Le dinoflagellé *Gambierdiscus toxicus* fut longtemps considéré comme unique organisme à l'origine de la ciguatéra. Depuis, les études ont montré que d'autres espèces de *Gambierdiscus*, ainsi que les genres *Ostreopsis* et *Prorocentrum* mais également certaines cyanophycées pourraient également être impliqués dans les intoxications de type ciguatérique. Le polymorphisme des symptômes et la complexité du phénomène ciguatéra seraient liés, en partie, à cette diversité des progéniteurs des toxines impliquées dans le syndrome ciguatérique. Nous ferons le point sur ces différents micro-organismes dans la section qui suit.

II.7.a.1 Les dinoflagellés ou dinophycées

Ces organismes, végétaux aquatiques unicellulaires, constituent une part importante du phytoplancton et un maillon essentiel de la chaîne trophique en tant que producteurs primaires. A ce jour, environ 2 200 espèces sont décrites. Les dinoflagellés incriminés dans les intoxications ciguatériques sont épiphytes et vivent dans les zones coraliennes de faible profondeur. Chez beaucoup d'espèces, la cellule est protégée par une thèque constituée de plaques cellulaires rigides, incrustées de silice.

Seulement 30 espèces de dinoflagellés sont connues pour produire des composés bioactifs dont certains sont de puissantes toxines (Yasumoto *et al.*, 1987 ; Bruslé 1997). Leurs efflorescences épisodiques constituent un danger potentiel directement pour la faune ou indirectement pour l'Homme. *Gambierdiscus* est le genre formellement impliqué dans la ciguatéra ; quant aux genres *Prorocentrum*, *Ostreopsis* ou *Coolia*, dinoflagellés benthiques partageant les mêmes biotopes que *Gambierdiscus* (Sugg and Van Dolah, 1999 ; Faust, 2009), avec qui ils constituent un complexe propice aux intoxications par voie bioaccumulative, ils pourraient également jouer un rôle dans la genèse des flambées de ciguatéra (Faust, 2009).

II.7.a.1.a Genre *Gambierdiscus*

Diversité spécifique et description

Proposée pour la première fois en 1977 comme agent étiologique de la ciguatéra (Yasumoto *et al.*, 1977 ; Bagnis *et al.*, 1980), le genre *Gambierdiscus* compte à ce jour dix espèces décrites (tableau 5) (Adachi and Fukuyo, 1979 ; Faust, 1995 ; Holmes, 1998 ; Chinain *et al.*, 1999b ; Litaker *et al.*, 2009). Initialement rattaché au genre *Diplopsalis*, la détermination par Adachi et Fukuyo de la formule thécale de *G. toxicus* (Adachi and Fukuyo, 1979) a conduit à l'établissement d'un nouveau genre :

- Division : Pyrrrophytes
- Classe : Dinophycées
- Ordre : Péridiniales
- Famille : Hétéraulacacées
- Genre : *Gambierdiscus*

Tableau 5 : Espèces de *Gambierdiscus* décrites (d'après Litaker *et al.*, 2009).

Espèce	Référence	Origines de la souche isolée
<i>G. toxicus</i>	Adachi and Fukuyo, 1979	Polynésie française (Tahiti), Nouvelle-Calédonie (Ouvéa), la Réunion
<i>G. belizeanus</i>	Faust, 1995	Belize, USA (Floride, Golfe du Mexique)
<i>G. yasumotoi</i>	Holmes, 1998	Singapour (îles Pualu Hantu)
<i>G. australis</i>	Chinain <i>et al.</i> , 1999b	Polynésie française (Raivava - Australes, Morurua - Gambiers), USA (Hawaï)
<i>G. pacificus</i>	Chinain <i>et al.</i> , 1999b	Polynésie française (Hao - Tuamotu ; Moorea - îles de la Société)
<i>G. polynesiensis</i>	Chinain <i>et al.</i> , 1999b	Polynésie française (Tubuai - Australes ; Rangiroa - Tuamotu)
<i>G. caribaeus</i>	Litaker <i>et al.</i> , 2009	Belize, Palau, Polynésie française (Tahiti), îles Caïmans
<i>G. carolinianus</i>	Litaker <i>et al.</i> , 2009	USA (Caroline du Nord)
<i>G. carpenteri</i>	Litaker <i>et al.</i> , 2009	îles Mariannes (Guam), Belize
<i>G. ruetzleri</i>	Litaker <i>et al.</i> , 2009	USA (Caroline du Nord), Belize

Ces microalgues unicellulaires sont de forme lenticulaire et caractérisées par une encoche ventrale (sulcus) où s'insèrent deux flagelles : le flagelle longitudinal ou sulcal, qui joue un rôle de gouvernail et le flagelle transversal ou cingulaire, qui ondule dans le cingulum (figure 14). La coloration globale de la cellule est variable, du vert clair au brun.

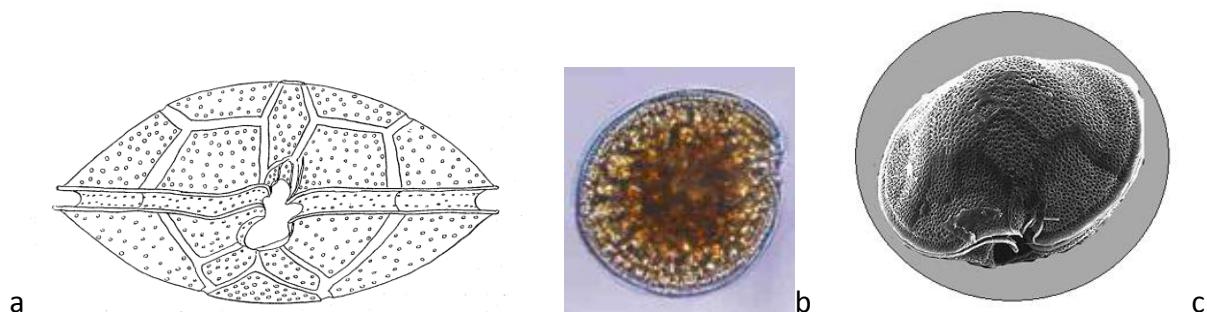


Figure 14 : Cellule de *Gambierdiscus* : (a) schéma de la vue ventrale (extrait de Adachi and Fukuyo, 1979), (b) vue latérale en microscopie optique (source ILM) et (c) vue ventrale en microscopie électronique à balayage (source IRD).

La thèque cellulosique se compose de deux valves : l'épithèque et l'hypothèque, chacune constituée d'une trentaine de plaques comportant des pores et séparées par des sutures sinueuses. Leurs formes, dimensions, nombre et arrangement varient selon les espèces (figure 15).

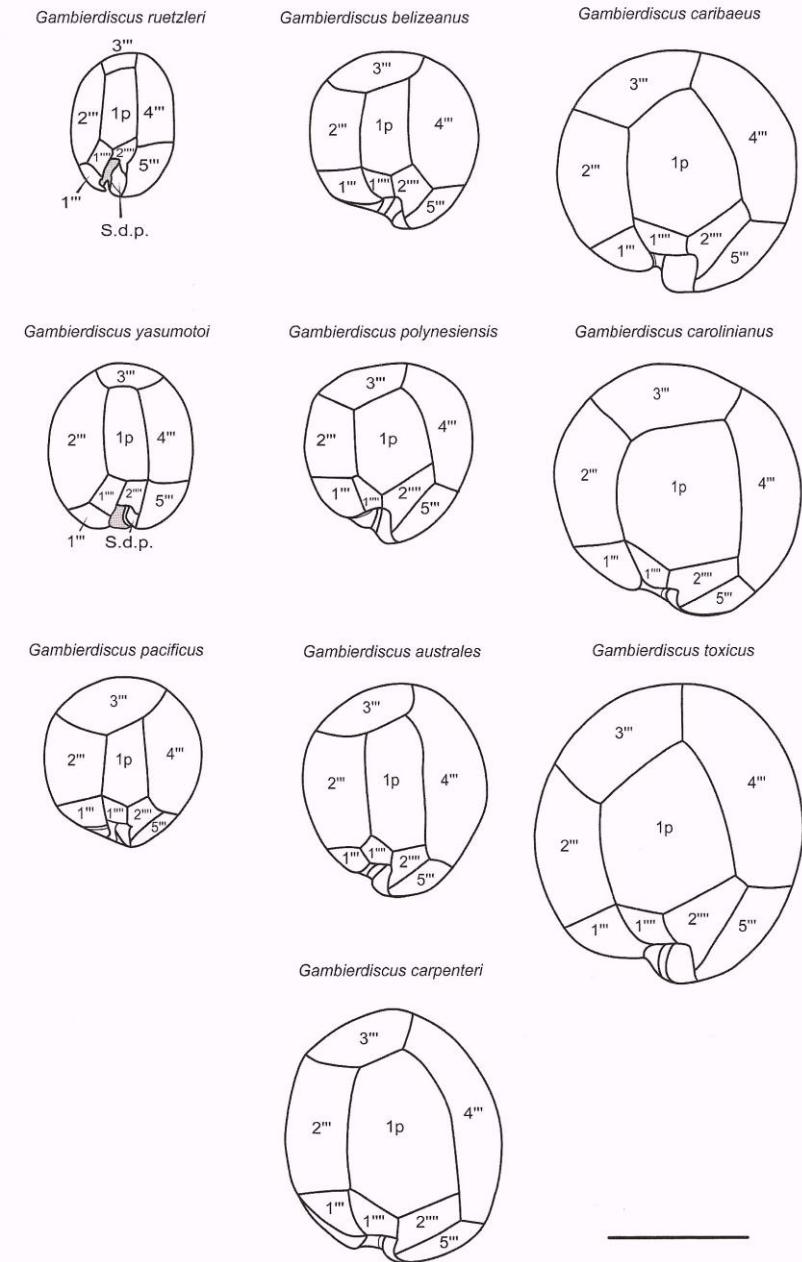


Figure 15 : Vues hypothétiques des dix espèces de *Gambierdiscus* décrites, barre d'échelle = 50 µm (extrait de Litaker et al., 2009).

La détermination des différentes espèces est délicate et demeure l'affaire de spécialistes. L'utilisation croisée d'outils d'identification est souvent nécessaire : microscopie optique, microscopie électronique à balayage ou encore analyses phylogénétiques (Chinain et al., 1999b ; Litaker et al., 2009). Précédemment, l'utilisation exclusive de critères morphologiques a pu être source d'erreur pour l'identification correcte des espèces

impliquées dans des intoxications ciguatériques (Litaker *et al.*, 2010). Une bonne identification est primordiale dans la compréhension du rôle spécifique joué par chacune d'entre elles dans le phénomène de la ciguatéra. Ainsi, l'espèce *G. toxicus* décrite par Adachi et Fukuyo en 1979 est désignée comme le lectotype (ne disposant plus de matériel pour certifier de son identification) et *G. toxicus* représentée par la lignée GTT-91 qui est conservée dans l'algothèque de l'ILM comme l'épitype de l'espèce (Chinain *et al.*, 1999a ; Litaker *et al.*, 2009). Litaker *et al.* (2009) proposent une clé dichotomique d'identification basée sur des critères morphologiques.

Ecologie de l'organisme - Site d'étude

Inféodé aux écosystèmes coralliens, *Gambierdiscus* a un mode de vie épiphytique. Les cellules sont observées directement fixées aux thalles des macroalgues, ou au sein des gazons algaux mixtes de recouvrement des substrats coralliens morts. On les retrouve sur de nombreux hôtes comme les Rhodophycées calcaires telles que *Jania* ou *Amphiroa*, sur les Chlorophycées comme *Halimeda* ou encore sur les Phéophycées comme *Turbinaria* (Bagnis *et al.*, 1980, Cruz-Rivera and Villareal, 2006 ; Parsons and Preskitt, 2007). Lors d'efflorescences, *Gambierdiscus* est souvent retrouvé en populations isolées mais denses (Dickey and Plakas, 2010).

Bien que possédant des flagelles, le dinoflagellé est peu mobile et demeure pratiquement absent en eau libre.

La reproduction se fait sur le mode isogame par bipartition oblique et la fréquence des mitoses varie de 2 à 10 jours selon les conditions du milieu et selon l'espèce. La culture de *Gambierdiscus* en laboratoire a fait l'objet de nombreuses études afin de déterminer ses conditions optimales de croissance et de production toxinique (Durand-Clément, 1986 ; Bomber *et al.*, 1988 ; Morton *et al.*, 1992). Très sensible aux modifications de luminosité, de salinité et de température, son développement est optimal dans les conditions suivantes :

- Température de 27-30°C,
- Salinité de 34,5 – 35,0‰,
- pH de 8,2 à 8,4,
- Milieu enrichi en sels nutritifs,
- Eclairage de l'ordre de 2 000 à 3 000 lux,
- Photopériode de 12 h : 12 h.

L'apparition d'efflorescence de *Gambierdiscus* est rapide avec une croissance de 0,1 à 0,55 division par jour (Withers, 1981 ; Chinain *et al.*, 2010b), leur disparition l'est également. La fréquence de surveillance doit donc être impérativement adaptée au caractère épisodique de ces efflorescences, à savoir au minimum une fois par mois.

Le taux de croissance de *Gambierdiscus* varie également en fonction de la compétition avec d'autres microalgues ou la présence de bactéries épiphytiques (Morton *et al.*, 1992).

Toxinogénèse de *Gambierdiscus*

Seules certaines lignées cellulaires de *Gambierdiscus* sont génétiquement capables de produire des CTXs et leur potentiel de production toxinique est variable (Roeder *et al.*, 2009 ; Chinain *et al.*, 2010b). Lors de la caractérisation de la GTX, seul 1 clone sur les 12 isolés des Iles Gambier produisait des toxines en quantité suffisante (Yasumoto, 2005).

De même, seules certaines souches cultivées à l’Institut Louis Malardé s’avèrent très toxiques, telle la lignée *G. polynesiensis* (TB-92) collectée à Tubuai en Polynésie Française. Sa toxicité enregistrée comme la plus élevée est de $1,4 \times 10^{-4}$ US / cellule (test souris) ou 11,9 pg d’équivalent de P-CTX-3C / cellule (test RBA) (Chinain *et al.*, 2010b). A l’inverse, d’autres souches également présentes dans l’algorithme de l’ILM telles *G. toxicus* GTT-91 et REN-1, ou *G. pacificus* HO-91 isolées à Tahiti et à la Réunion, se sont avérées atoxiques. L’observation d’efflorescences de *Gambierdiscus* ne s’accompagne donc pas obligatoirement d’une flambée de ciguatéra.

De façon similaire, *in natura*, les cellules sauvages peuvent produire des toxines avec de fortes variations. Cette production toxinique dépend (i) des facteurs génétiques et (ii) des conditions environnementales (Chinain *et al.*, 1999a ; Richlen *et al.*, 2008). Ainsi un épisode ciguatoxique sera d’autant plus important que la (ou les) souche(-s) de *Gambierdiscus* composant l’efflorescence produira(-ont) des profils toxiniques de forte toxicité et proliférera(-ont) dans des conditions favorables à son (leurs) efflorescence(s) et à sa (leur) production(s) toxinique(s) (Richlen *et al.*, 2008). Ces variations permettent d’expliquer en partie les différents types de ciguatoxicité et de symptômes observés dans les différentes régions endémiques du globe : Océan Pacifique, Indien et Atlantique (Dickey and Plakas, 2010).

La variabilité inter- et intraspécifique de la production en toxines chez *Gambierdiscus*, également observée chez d’autres dinoflagellés et cyanobactéries marines, témoigne de l’extrême complexité des mécanismes régissant la toxinogénèse chez ces micro-organismes producteurs de toxines. A ce jour, les bases génétiques de la biosynthèse des CTXs restent encore mal connues. La toxicité chez *Gambierdiscus* pourrait être le fait de gènes ou de familles de gènes. De par leur structure, les CTXs, polyéthers polycycliques issues du métabolisme secondaire de *Gambierdiscus*, sont souvent assimilées à la grande famille des polykétides. Les enzymes impliqués dans la synthèse de ces polykétides sont désignés sous le terme générique de polyketide synthase (PKs). Leur caractérisation ouvrirait la voie à des outils hautement fiables de surveillance environnementale permettant ainsi de prévenir, en temps réel, l’apparition de zones ciguatériques dans une zone donnée.

II.7.a.1.b Les autres dinoflagellés

Prorocentrum est un dinoflagellé benthique connu pour produire des toxines diarrhéiques (AO et les DTXs) responsables du syndrome du DSP (cf ch.1.I.b) (Morton *et al.*, 1998 ; Dickey *et al.*, 1990). Les espèces *P. lima* et *P. mexicanum* ont été isolées de zones ciguatoxiques et sont considérées comme producteurs potentiels de toxines impliquées dans

les intoxications de type ciguatérique (Durand-Clément, 1986). Ce genre a été mis en cause lors d'intoxications sévères par consommation de barracuda (Frémy et Lassus, 2001).

Quant à *Ostreopsis*, il est connu pour produire les PTXs (cf. ch.2.III.4.b). L'espèce est benthique mais remonte épisodiquement en surface lors d'efforescence. La toxine peut alors se concentrer dans la chaîne alimentaire, ce qui explique l'implication des poissons majoritairement planctonophages dans le clupéotoxisme (cf. ch.1.I.2.c). Récemment, des efflorescences ont été observées au niveau des côtes méditerranéennes italiennes, françaises et espagnoles (Katikou, 2007). Les conséquences de ces blooms sont néfastes, aussi bien pour la santé humaine (contact direct ou indirect par bioaccumulation) que pour l'écosystème (hypoxie du milieu entraînant de fortes mortalités d'invertébrés, notamment). A plusieurs reprises, certaines espèces d'*Ostreopsis* ont été impliquées dans des épisodes d'intoxications de type ciguatérique (Shears and Ross, 2009).

Amphidinium et *Coolia* sont des dinoflagellés également suspectés d'être impliqués dans le syndrome ciguatéra (Faust, 2009).

La zone géographique de répartition de ces dinoflagellés se situe classiquement au niveau de la ceinture tropicale du globe mais peut s'étendre jusqu'aux latitudes supérieures, notamment en mer Méditerranée (Aligizaki and Nikolaidis, 2006 ; Aligizaki *et al.*, 2008 ; Aligizaki *et al.*, 2009) (cf. ch.1.II.3.a).

II.7.a.2 Les cyanobactéries

Au début des recherches sur la ciguatéra, Randall (1958) puis Banner (1961) incriminaient des algues filamenteuses comme source potentielle de l'intoxication ciguatérique. En 1964 à Bora Bora (îles de la Société, Polynésie Française), Bagnis rapporte de sévères intoxications de type ciguatérique ayant entraîné la mort de deux personnes à la suite de la consommation de bénitiers (Bagnis, 1967). Ces bénitiers, *Tridacna maxima*, pêchés dans une zone réputée ciguatoxique étaient recouverts d'une algue bleuâtre, comme ce fut le cas trente ans auparavant dans une île voisine, Tahaa, où les pêcheurs signalèrent le même type d'intoxications, et la présence d'algues filamenteuses noires. Ces algues filamenteuses pourraient être les algues bleues plus tard dénommées cyanophycées ou cyanobactéries (cf. ch2).

En 1992, Hahn et Capra accusent la cyanobactérie pélagique *Trichodesmium erythraeum* d'être impliquée dans des cas d'intoxication ciguatérique. Cette Oscillatorielle synthétiserait des composés chimiquement proches des CTXs dont les effets sur souris leur ont valu la dénomination de « CTXs-like ». L'année suivante, Endean *et al.* (1993) isolent à partir d'extraits de *T. erythraeum* des composés hydrosolubles et liposolubles toxiques de natures chimiques et toxicités similaires à celles de chairs de maquereaux (*Scomberomorus commerson*) ciguatoxiques pêchés dans la zone d'efflorescence de *T. erythraeum*.

II.7.b Organismes marins incriminés

II.7.b.1 Poissons

Certaines espèces sont reconnues par les populations insulaires pour être à haut risque de ciguatera (loches, lutjans, anglais, murènes, barracudas, carangues). Par ailleurs, les espèces en fin de chaîne alimentaire ou les grands spécimens sont souvent reconnus pour être fortement ciguatériques. *A contrario*, les espèces pélagiques, dites du large (thon, thazard, etc.), seraient reconnues pour être indemnes de toxines. Toutefois, toutes ces informations basées sur l'expérience des pêcheurs ou des consommateurs n'ont pas été validées scientifiquement.

Variabilité interspécifique

Il est difficile de désigner formellement des espèces qui seraient plus toxiques que d'autres, tant les conditions environnementales propres à chaque site de pêche et le comportement alimentaire propre à chaque espèce pisciaire ont un impact sur la toxicité de chaque spécimen. Environ 400 espèces sont susceptibles de provoquer des intoxications ciguatériques (Halstead, 1965). Les acanthuridés, serranidés, murénidés, carangidés, labridés, lutjanidés, lethrinidés et sphyraenidés sont des familles potentiellement toxiques.

En fait, tout poisson lagunaire doit être considéré comme potentiellement porteur de toxines ciguatériques. Bagnis estime que « beaucoup » de poissons récifaux possèdent en permanence une teneur en toxine résiduelle et variable (Bagnis et Vernoux, 1975 ; Dickey and Plakas, 2010). Ces concentrations varient en fonction des épisodes d'efflorescences microalgales toxiques qui constituent le premier maillon de la chaîne trophique (Lewis and Holmes, 1993 ; Lewis and Ruff, 1993) (cf. ch.1.II.7.c). Par ailleurs, la toxicité évaluée d'un poisson n'a de valeur que pour un temps donné, et est susceptible de varier dans le temps et dans l'espace pour une espèce donnée.

Variabilité physiologique

Les CTXs sont des toxines liposolubles et s'accumulent préférentiellement dans les organes à forte teneur lipidique (foie, cerveau, gonades, ...). La concentration des toxines du foie a été évaluée comme étant 50 fois plus importante que celle des muscles (Lehane and Lewis, 2006).

Cette répartition physiologique des toxines varie en fonction des espèces de poissons. Leurs capacités d'accumulation, de biotransformation, de compartimentation ou de dégradation des toxines ne sont que peu documentées. Indépendamment de leur régime alimentaire, leur physiologie agit sur les toxines ingérées et leur confère un potentiel toxique (biotransformation par voie oxydative des GTXs), un panel toxinique et une répartition toxinique selon les différents organes, variable dans le temps.

Les formes sévères ou mortelles d'intoxications sont souvent liées à la consommation des viscères et de la tête, organes dits « concentrateurs » des CTXs (Hamilton *et al.*, 2009). Il semble que les poissons montrent une certaine tolérance vis-à-vis de ces toxines, qui leur permet d'accumuler des taux élevés de CTXs sans en être affectés, mais fort heureusement

pour l'homme, jusqu'à un seuil limite qui finit par leur être fatal (Lewis, 1993). Les plus fortes teneurs en toxines ont été détectées dans les murènes (*Gymnothorax javanicus*), ce qui leur a longtemps valu le statut privilégié de source d'approvisionnement en CTXs pour les laboratoires.

Les populations sollicitent souvent les chercheurs afin de leur présenter une liste d'espèces toxiques. Or, comme nous avons pu le voir, l'évaluation de la toxicité d'un poisson n'est valable que pour un temps, un individu et un site donné. Aussi, extrapoler des valeurs de toxicité issues d'individus isolés à l'espèce entière provenant de divers biotopes, n'est pas recommandé.

Le risque d'intoxication peut tout de même être minimisé en sélectionnant certaines espèces dont l'innocuité est souvent reconnue, ou certaines tailles à ne pas dépasser.

II.7.b.2 Autres produits marins impliqués dans le syndrome de la ciguatéra

Des bénitiers (*Tridacna* spp.) et des gastéropodes (*Turbo* spp. ou *Trocha*) ont provoqué ponctuellement des cas graves d'intoxications assimilés à l'intoxication ciguatérique (Bagnis, 1967 ; Kanno *et al.*, 1976 ; Angibaud *et al.*, 2000 ; Laurent *et al.*, 2008). D'autres organismes marins ont été impliqués dans des intoxications ciguatériques comme le céphalopode (Zlotnick *et al.*, 1995). Cependant, à ce jour, les recherches n'ont pas permis d'élucider formellement ce ou ces type(s) d'intoxication(s) alimentaire(s).

Plus récemment, des cas d'intoxication par consommation d'oursins rappelant l'intoxication ciguatérique ont également été observés à Rurutu (Australes, Polynésie Française). Des recherches sont actuellement menées par l'ILM et l'IRD pour comprendre l'étiologie de ces intoxications émergentes.

II.7.c Chaîne de transfert

La chaîne alimentaire ciguatérigène est lagunaire et majoritairement pisciaire (Lewis and Holmes, 1993). Le schéma de développement de la ciguatéra se fait selon cinq étapes successives (figure 16) :

1. Dégradation du biotope corallien,
2. Prolifération des micro-organismes toxinogènes sur les substrats vierges ainsi générés où peuvent proliférer les macro-algues supports,
3. Transfert des toxines algales vers le second maillon de la chaîne (poissons herbivores),
4. Bioconcentration des toxines au niveau des prédateurs supérieurs (poissons carnivores),
5. Intoxication humaine.

Le déterminisme du phénomène de la ciguatéra est complexe en raison des multiples variables forçantes s'exerçant à chaque niveau trophique de la chaîne alimentaire. Leur étude s'avère donc primordiale pour la compréhension de la biogenèse de ce phénomène écotoxicologique.

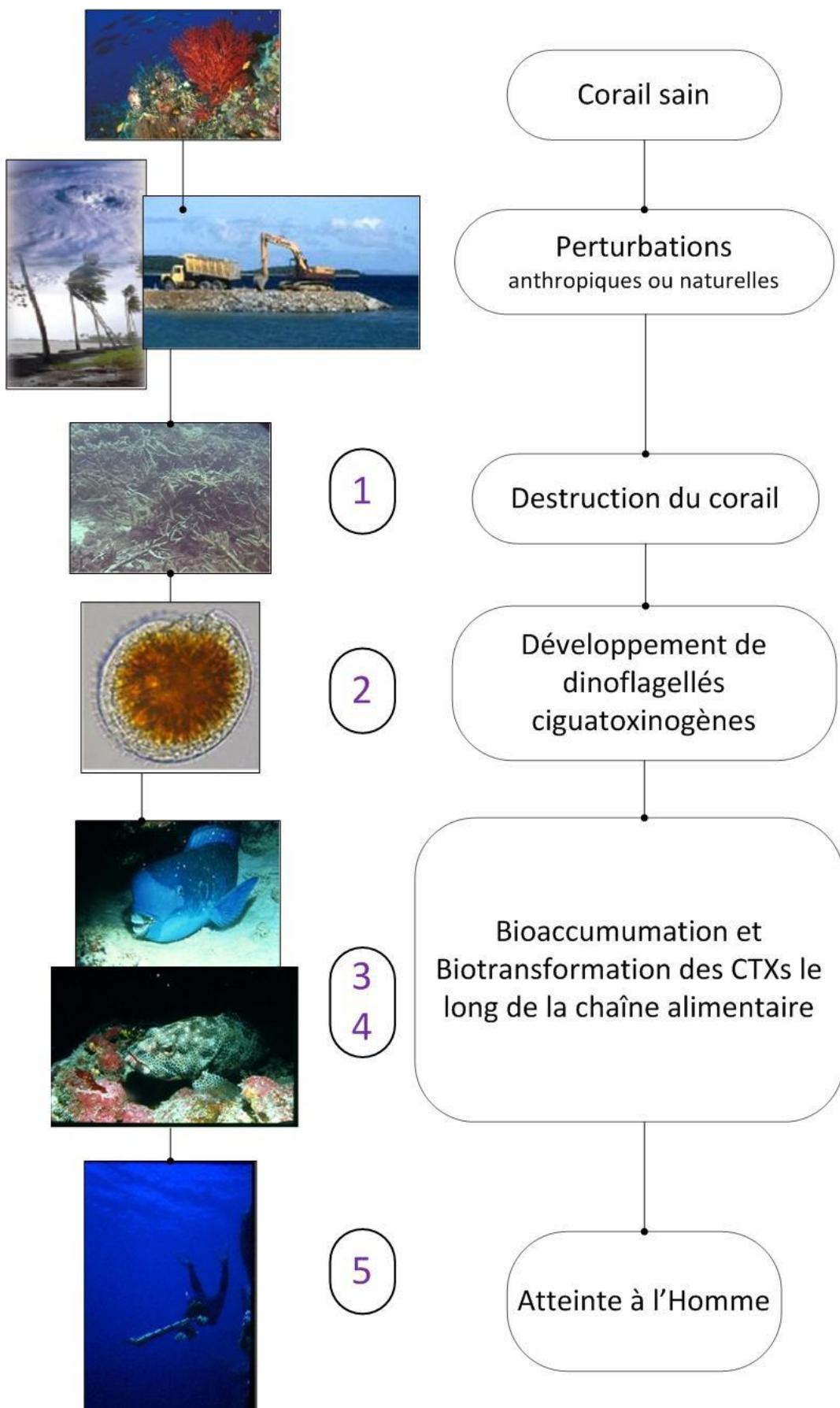


Figure 16: Biogenèse de la ciguatera.

Une flambée sera d'autant plus violente que les organismes de bas étage trophique seront toxiques ou porteurs des toxines les plus virulentes. Les facteurs à l'origine de ce caractère virulent sont: (i) la diversité et le potentiel toxique élevé des différents analogues synthétisés (ii) un niveau de production plus important. (cf. ch.1.II.7.a)

Le phénomène écologique de la ciguatéra est basé sur les principes de biomagnification (bioconcentration + bioaccumulation) associée à la biotransformation des toxines le long de la chaîne alimentaire. Lors d'un épisode ciguatérique, les herbivores sont affectés les premiers, puis successivement, les maillons supérieurs à savoir les poissons carnivores et l'Homme. L'augmentation des concentrations toxiniques associée à leur biotransformation par voie oxydative (augmentation de la toxicité) confère aux maillons successifs un potentiel toxique supérieur en qualité et en quantité toxinique.

II.7.d Déterminisme du phénomène

Une flambée ciguatérique est épisodique et imprévisible, et se caractérise par une distribution aléatoire dans l'espace et dans le temps. Les différents niveaux de variabilité concernent :

- La zone,
- La saison ou l'année,
- Les espèces touchées et impliquées,
- La sensibilité individuelle des consommateurs

Bagnis et Vernoux (1975) considèrent que les CTXs sont présentes en permanence dans l'environnement récifal, à des taux résiduels variables selon le régime alimentaire des poissons. Seul un test de haute sensibilité peut alors détecter ce niveau résiduel et latent dans les organismes marins.

Lorsque la santé des récifs est bonne, la concurrence entre les différentes espèces permet d'obtenir un équilibre limitant les proliférations d'une population aux dépens des autres êtres vivants.

II.7.d.1 Composante spatiale

Les zones endémiques sont essentiellement les régions insulaires du globe mais les récifs continentaux sont également affectés (ex : Etats du Queensland en Australie, Floride au Etats-Unis, la Grande Terre en Nouvelle-Calédonie) (Legrand, 1991). Localement, les lagons offrent des conditions favorables au développement des dinoflagellés ciguatoxinogènes.

Les connaissances empiriques des populations insulaires leur permettent de délimiter de manière « précise » les zones récifales dites grattées. Ainsi dans les îles Gilbert (Archipel des Kiribati), Jane Cooper rapporte que les récifs ciguatériques sont tous situés sous le vent c'est-à-dire au sud-ouest et à l'ouest de l'archipel (Banner *et al.*, 1963). D'après les observations de Faust (2009), les zones lagonaires protégées de faibles profondeurs, où peu d'échanges avec les eaux extérieures favorisent la concentration en sels nutritifs, sont des environnements propices aux flambées ciguatérigènes.

A l'inverse, d'autres études menées en Polynésie montrent que les zones ciguatoxiques sont exposées aux vents ou localisées au niveau des passes, point d'ouverture vers l'océan (Bagnis, 1977). Le fort hydrodynamisme semblerait alors dans ce cas être un des facteurs favorisant la ciguotoxicité du lagon. Ces observations contradictoires suggèrent qu'un facteur pourra être favorisant pour un biotope donné alors qu'il pourra avoir l'effet inverse pour un autre biotope.

En tout état de cause, il s'avère que même si les populations locales connaissent les zones de pêche à éviter, les raisons de l'apparition du phénomène ne sont souvent pas comprises.

II.7.d.2 Composante temporelle - Saisonnalité

Le caractère saisonnier d'une flambée ciguatérique dépend de nombreux critères : nature et intensité des facteurs déclenchant, type d'environnement, géomorphologie des zones lagonaires, espèces pisciaires incriminées (écologie et physiologie), facteurs de sensibilité individuelle des patients intoxiqués, etc.

Certains considèrent qu'il existe une « saison de gratte » qui correspondrait à la période de floraison des coraux, vers la fin du printemps et le début de l'été (novembre, décembre). Cependant, le caractère saisonnier des flambées a fait l'objet de nombreuses études scientifiques, sans qu'aucun consensus ne soit obtenu (Lawrence *et al.*, 1980 ; Legrand et Bagnis, 1991). L'étude de Château-Degat *et al.* (2005) par exemple, menée sur une période de huit ans, ne met pas en évidence de saisonnalité dans le phénomène ciguatérique. A l'inverse, les données épidémiologiques recueillies en Nouvelle-Calédonie montrent une augmentation des intoxications à la saison chaude du mois d'octobre au mois de février (rapport DDASS 2007, NC). Ces informations ne peuvent toutefois être extrapolées, puisqu'il faudrait pondérer ces données avec la fréquence de pêche. En effet, l'activité de pêche augmente à cette période en raison des conditions météorologiques favorables et des vacances.

Grâce aux observations empiriques et aux croisements des données recueillies lors d'études épidémiologiques ou environnementales, Bagnis et Vernoux (1975) estiment à 5-12 ans le délai nécessaire aux poissons pour être de nouveau consommés après une flambée de ciguatéra. En particulier, les espèces *Ctenochaetus striatus* et *Plectropomus leopardus* redeviennent quasiment saines respectivement 5 et 10 ans après un épisode toxique. Enfin, Quod et Turquet (1996) estiment que la durée du phénomène peut s'étendre sur 15 à 20 ans.

En Polynésie française, les données d'écologie et d'épidémiologie collectées de février 1993 à décembre 2001 montrent (i) une croissance des populations de *Gambierdiscus* 13 à 17 mois suivant l'augmentation des températures des eaux de surface et (ii) une augmentation des intoxications ciguatériques 3 mois après une efflorescence de *Gambierdiscus* (Château-Degat *et al.*, 2005). L'objectif de ce type de modèle est d'utiliser une donnée simple (ici la température) pour tenter de prévenir les recrudescences d'intoxications ciguatériques ; les auteurs concluent que des intoxications ciguatériques

peuvent survenir 20 mois après une augmentation significative des températures de surface. Mais de nombreux paramètres entrant dans le calcul de prédiction du modèle restent négligés ou omis : les divers facteurs de croissance des dinoflagellés, les lieux de pêche du poisson毒ique, la sous-estimation des cas déclarés.

Par ailleurs, d'autres études menées en Polynésie montrent qu'un délai de 4 à 7 mois est nécessaire entre un épisode de mortalité corallienne massive par blanchiment du corail et la survenue d'une efflorescence à *Gambierdiscus* (Chinain et al., 1999a).

En termes de méthodologie de surveillance des zones ciguatériques, ces informations vont nous permettre de définir la fréquence des prélèvements des populations de micro-organismes. Ainsi, il sera préconisé d'effectuer un suivi des dinoflagellés (*Gambierdiscus*, *Prorocentrum* et *Ostreopsis*) sur les macroalgues sélectionnées selon une fréquence mensuelle minimum, comme cela a pu être expliqué précédemment en tenant compte du cycle de croissance de *Gambierdiscus* (cf. ch.1.II.7.a).

II.7.d.3 Facteurs favorisant le développement de zones ciguatoxinogènes

L'incidence de la ciguatera est reliée aux changements de l'environnement marin (Château-Degat et al., 2005). Bien qu'il existe peu d'études mettant en évidence de façon formelle le lien entre des perturbations de l'écosystème et le déterminisme du potentiel ciguatoxique d'une zone donnée, l'ensemble des observations empiriques permettent de dire qu'une zone devient « grattueuse » à la suite de perturbations de l'environnement. Cependant, d'un point de vue scientifique, il est difficile de corrélérer ces observations aux connaissances actuelles sur les écosystèmes récifaux. Les divers facteurs de destructions et de perturbations favorisant les risques de ciguatera auxquels est soumis le récif peuvent être regroupés en facteurs naturels *versus* les facteurs liés à l'action de l'homme (facteurs anthropiques) (Bagnis, 1987 ; Frémy et Lassus, 2001).

Perturbations naturelles

Elles peuvent être de deux ordres :

(i) des **facteurs biotiques** tels que des organismes marins comme les *Acanthaster* ou les espèces corallivores, les surcharges en sels nutritifs, les marées rouges, le développement important de cyanobactéries ou,

(ii) des **facteurs abiotiques** tels que les fortes variations de températures, de salinité ou de pH, l'hydrodynamisme (exemple des tsunamis), des concentrations anormales en éléments chimiques (exemple des métaux), la pluviométrie, la turbidité, la luminosité ou des phénomènes climatiques plus globaux (El Niño, cyclone ou dépressions tropicales, ...).

Perturbations anthropiques

L'Homme impacte également les zones littorales de par ses activités parmi lesquelles on peut citer : les apports en éléments chimiques ou en nutriments (phénomène d'eutrophisation), les perturbations mécaniques (dragage des récifs pour aménagements littoraux, les zones portuaires, les ancrages) ou encore les changements dans la composition

biologique d'un écosystème et touchant plus particulièrement les espèces fonctionnelles (importation d'espèces perturbant l'équilibre fonctionnel ou diminution de prédateurs).

La liste de ces facteurs n'est pas exhaustive : tout événement susceptible de perturber les polypes constituant les colonies récifales, voire entraîner la mort du corail sur des zones plus ou moins étendues, doit être considéré comme un facteur favorisant les zones ciguatoxiques. Car ces zones vierges de coraux sains peuvent, être alors propices aux développement des macroalgues support privilégiés des microalgues ciguatoxinogènes, éléments déclencheurs la chaîne ciguatérique.

Enfin, le réchauffement global qu'il soit d'origine anthropique ou naturelle est une des causes de fortes mortalités de colonies récifales ; il est donc également à considérer comme un des facteurs ciguatoxinogènes (Baker *et al.*, 2008 ; Llewelyn, 2009; Dickey and Plakas, 2010).

La multitude des paramètres à prendre en compte ainsi que leurs interconnexions parfois complexes, explique pourquoi il s'avère souvent difficile voire impossible de prédire le potentiel toxique d'un poisson dans une zone récifale donnée.

La période de latence, parfois relativement importante qui s'écoule entre l'impact, la morbidité corallienne et ses effets perceptibles au niveau de l'Homme a rarement été étudiée en détail. Dans le chapitre 3, nous nous proposons d'aborder spécifiquement ce problème grâce à la mise en place d'une étude prospective écotoxicologique dans une zone anthropisée de Nouvelle-Calédonie.

Problématiques et

Objectifs

Problématique et objectifs de thèse

I. Contexte de travail

En Nouvelle-Calédonie comme dans de nombreuses îles du Pacifique, les populations vivent avec la ciguatéra qu'ils connaissent depuis des générations. Ils ont appris à éviter les zones de pêches connues comme toxiques ou à reconnaître les espèces de poissons à plus « fort risque » ciguatérique ou encore connaissent des techniques permettant de détecter les poissons toxiques. Certains ont également développé un arsenal de remèdes pour prévenir ou soigner la ciguatéra. Cependant, nous avons pu voir, dans le premier chapitre, que ce phénomène complexe reste la cause du plus grand nombre d'intoxications par organismes marins au monde, dont le coût peut s'avérer très élevé pour les communautés touchées. Peu d'études scientifiques se sont attachées avec succès à l'élucidation complète du déterminisme de ce phénomène écotoxicologique.

Et pourtant, de manière globale, les recherches sur la ciguatéra deviennent un enjeu sanitaire et socio-économique majeur en raison de l'augmentation des migrations humaines, de la rapidité du transport des produits de la mer, de l'amplification de leur consommation mondiale et des bouleversements climatiques en cours. Aussi, il nous paraît important de mieux comprendre le déterminisme écologique de ce phénomène afin de mieux le prévenir.

De récents travaux de recherche menés dans la tribu d'Hunêté à Lifou (îles des Loyauté en Nouvelle-Calédonie) ont suggéré l'implication de cyanobactéries benthiques dans des intoxications de type ciguatérique à la suite de la consommation de bénitiers et de poissons herbivores (perroquets) (Laurent *et al.*, 2008). Ces auteurs ont montré que ces cyanobactéries, de l'ordre des Oscillatoriiales et appartenant à l'espèce *Hydrocoleum lyngbyaceum*, produisaient un complexe toxinique dont les effets s'apparentent à l'action des CTXs et à celui des toxines paralysantes.

Alors que l'implication des dinoflagellés dans le phénomène de la ciguatéra est établie, celle des cyanobactéries est tout à fait nouvelle et engendre de nombreuses questions :

- Existe-t-il d'autres espèces de cyanobactéries susceptibles d'être impliquées dans ce phénomène?
- Quelle est la nature chimique des toxines synthétisées?
- Les bénitiers et les poissons herbivores sont-ils des vecteurs de ces toxines?
- Quels sont les facteurs favorisant les efflorescences à cyanobactéries?
- L'implantation et la prolifération des cyanobactéries sont-elles liées à la dégradation du corail comme cela est suggéré à Lifou?
- Plus généralement, quels sont les facteurs favorisant le développement des zones ciguatérigènes?

Nos hypothèses de travail sont les suivantes :

« Les cyanobactéries synthétisent des composés toxiques similaires aux CTXs associées à d'autres toxines paralysantes. Les organismes tels que les bénitiers ou les poissons herbivores exposés à ces efflorescences cyanobactériennes et contaminés par bioaccumulation constituent alors un danger pour l'Homme. »

« Le risque potentiel lié aux proliférations des cyanobactéries ou des dinoflagellés ciguatoxinogènes est corrélé aux perturbations environnementales, et notamment celles d'origine anthropique. »

Pour vérifier l'ensemble de ces hypothèses, ce travail de thèse s'articulera autour de deux axes :

Axe 1: Etude de l'implication des cyanobactéries dans le phénomène écotoxicologique de la ciguatera, et lien avec la contamination des bénitiers : site d'étude de Lifou,

Axe 2: : Liens entre les facteurs de perturbations d'un environnement et le développement de zones ciguatérigènes : sites d'étude de la Baie de Prony et d'Ouvéa

II. Objectifs de l'étude

Axe 1 : Etude de l'implication des cyanobactéries dans le phénomène écotoxicologique de la ciguatera et lien avec la contamination des bénitiers (site d'étude à Lifou).

Ce volet fait suite à l'étude menée dès 2004 en Nouvelle-Calédonie dans le village de Hunetë à Lifou sur la mise en évidence d'un nouveau degré de complexité du phénomène écotoxicologique (Laurent *et al.*, 2008).

Les activités de recherche mises en œuvre cibleront plus particulièrement :

- Le suivi des populations de dinoflagellés et de cyanobactéries,
- La mise en évidence de leur potentiel toxinique,
- La caractérisation des familles toxiniques en jeu,
- La caractérisation des voies de transmission des toxines au sein de la chaîne alimentaire.

Axe 2 : Liens entre les facteurs de perturbations d'un environnement et le développement de zones ciguatérigènes.

L'étude menée à Lifou a permis de souligner la relation entre les impacts humains dans l'environnement et les risques d'intoxications, sur un mode rétrospectif. A l'inverse, le site de Prony est le lieu idéal pour une **étude prospective** du phénomène en raison de l'implantation d'un site minier dans le sud de la Grande Terre. Un plan de surveillance y sera mis en oeuvre afin de mettre en évidence les facteurs favorisant les zones ciguatérigènes. L'évolution du site

de Prony sera comparée à celle du site d'Ouvéa sélectionné pour sa réputation d'île indemne de ciguatéra.

Cette thèse présente ainsi deux aspects novateurs :

- 1) La caractérisation des risques toxiques liés au développement de certaines cyanobactéries marines et leur impact sanitaire sur la chaîne alimentaire et, partant sur la santé humaine,
- 2) L'Etude prospective d'une zone tropicale soumise à des pressions anthropiques.

Les travaux réalisés s'intègrent dans le volet Environnement et écotoxicologie de la thématique « Ciguatéra », mené au sein du laboratoire de l'UMR 152 de l'IRD depuis plusieurs années, en partenariat avec des équipes reconnues dans le domaine.

Chapitre 2 :

*Implication des cyanobactéries dans le
phénomène écotoxicologique de la
ciguatéra et
leur lien avec la toxicité des bénitiers*

Chapitre 2 : Implication des cyanobactéries dans le phénomène écotoxicologique de la ciguatéra et leur lien avec la toxicité des bénitiers

Les cyanobactéries et leur lien avec la ciguatéra

Comme nous l'avons abordé dans le premier chapitre, d'après les données bibliographiques, les cyanobactéries sont suspectées d'être une source de toxines, dans la chaîne alimentaire pisciaire, pouvant conduire à des empoisonnements chez l'Homme de type ciguatérique (Endean *et al.*, 1993). Un composé létal pour la souris, en injection i.p., a été extrait d'échantillons de *Trichodesmium erythraeum* et, de quatre espèces de mollusques (trois bivalves : *Pinctada margaritifera*, *Lopha cristagalli*, *Ostrea nomades* et un gastéropode : *Littorinidae* sp.) et d'un poisson molluscivore (*Trachinotus blochii*), récoltés à proximité de l'efflorescence. Les études chromatographiques et les symptômes enregistrés chez la souris étaient en faveur de substances proches des CTXs (Hahn and Capra, 1992). Alors que l'implication des dinoflagellés dans le phénomène ciguatérique est établie, celle des cyanobactéries reste encore à prouver.

Historique et contexte

En 2004, à Lifou, Ile des Loyautés, une alerte sanitaire a été lancée par la Province des Iles à la suite d'intoxications ciguatériques atypiques et sévères sévissant depuis janvier 2001 dans la tribu de Hunêtë. A la demande des services sanitaires, l'équipe de Dominique Laurent de l'IRD a étudié le phénomène.

L'étude épidémiologique préliminaire a révélé des intoxications à caractère ciguatérique ayant nécessité plusieurs hospitalisations, suite à la consommation principalement de poissons herbivores et de bénitiers, et caractérisées par une apparition rapide des symptômes (brûlure de la bouche et de la gorge). Dans la tribu concernée, la population avait défini une zone à risque où la majorité des poissons, mais aussi des bénitiers, ayant causé les intoxications avait été pêchée.

Les premières observations et études de la zone ont mis en évidence l'absence de *Gambierdiscus* et la présence de large tapis de cyanobactéries recouvrant des coraux fortement dégradés. L'ensemble de ces premières données poussa à s'interroger sur la provenance et le type de toxines mises en jeu.

S'agissait-il : (i) d'une intoxication ciguatérique classique, (ii) d'une intoxication plus complexe incluant d'autres toxines en plus des CTXs ou alors (iii) d'une toute autre forme d'intoxication ?

Les premiers résultats de l'étude menée de 2005 à 2006 dans le cadre de mon Volontariat Civil à l'Aide Technique (VCAT) ont mis en évidence un potentiel toxique chez les bénitiers (*Tridacna* sp.), les poissons herbivores (Scaridés) ainsi que chez les cyanobactéries identifiées comme étant *Hydrocoleum lyngbyaceum*. Ces résultats, présentés en introduction de la partie « Etudes écotoxicologiques de Hunëtë à Lifou », ont fait l'objet d'une première publication dans *Harmful Algae* :

Laurent D., Kerbrat A.S., Darius H.T., Girard E., Golubic S., Benoit E., Sauviat M.P., Chinain M., Molgó J., Pauillac S. 2008. Are cyanobacteria involved in Ciguatera Fish Poisoning-like outbreaks in New Caledonia? Harmful Algae, 7(6) : 827-838.

Cette étude illustre une des problématiques de base abordées dans cette thèse, à savoir le rôle des cyanobactéries dans la ciguatera, le terrain d'étude principal étant la zone de pêche contaminée de Lifou. En effet, le site de Hunëtë est un lieu d'étude idéal pour observer l'évolution du phénomène, pour y étudier la toxicité à différents niveaux trophiques, la saisonnalité des cyanobactéries et la présence concomitante de dinoflagellés.

Dans ce chapitre 2, nous présenterons tout d'abord les cyanobactéries marines toxiques puis les avancées des recherches menées sur le site de Lifou seront exposées. Ensuite, l'étude menée sur les cyanobactéries pélagiques *Trichodesmium* qui a conduit à deux publications (dont l'une est en cours d'évaluation), sera détaillée en appui aux résultats concernant la toxicité des cyanobactéries benthiques.

I. Introduction

I.1 Les cyanobactéries marines toxiques

I.1.a Généralités

Les cyanobactéries aussi appelées cyanophycées (*Cyanophyceae*) ou algues bleues constituent une sous-classe des bactéries. Ces différentes appellations se justifient par des propriétés communes à la fois aux bactéries (absence de membrane nucléaire et plastidiale, de mitochondrie, de réticulum endoplasmique et de dictyosome, et présence de paroi cellulaire Gram- avec de la muréine) et aux algues (présence de chlorophylle (a) et de deux photosystèmes, utilisation de l'eau comme donneur d'électron pour la photosynthèse productrice oxygénique). Prokaryotes photosynthétiques autotrophes, les cyanobactéries ne présentent donc ni noyau véritable, ni plaste, ni reproduction sexuée.

Elles font partie des organismes les plus anciens connus sur la planète (3,5 milliards d'années). Elles ont permis le développement de la vie sur terre grâce à leur production d'O₂ par photosynthèse (la Grande Oxydation), à leur contribution au premier puits biologique de carbone et enfin à une « désacidification » des océans lorsqu'elles se sont organisées en stromatolithes (Camoin and Gautret, 2006). En effet, ces colonies fixées sont capables de produire du calcaire et certaines de ces formes sont parmi les plus anciennes, comme dans l'ouest de l'Australie dans la baie de Shark ou au parc national de Yalgorup (photos 7 et 8).



7



8

Photos 7 et 8: (1) La baie Shark en Australie est un des très rares endroits du monde qui abritent encore des stromatolithes en développement actif. (2) Stromatolithe contemporain, en croissance, sur le littoral ouest de l'Australie, dans le parc national de Yalgorup.

La diversité morphologique des cyanobactéries s'est développée depuis 2 milliards d'années. Ces microorganismes regroupent ainsi environ 2 000 espèces réparties en 150 genres (Lavoie *et al.*, 2007). Aujourd'hui, des formes très variées sont rencontrées : des unicellulaires ou des filaments dépassant un mètre de long et pouvant se subdiviser en fragments, ou plus rarement en forme de plaques, ou de colonies irrégulières. Les formes unicellulaires

(coccospores) et filamenteuses (trichomes) sont les plus souvent rencontrées et constituent deux des principales classes: les coccogonophycidées (formes solitaires ou coloniales) et les hormogonophycidées (formes coloniales filamenteuses).

Les stratégies de résistance

Planctoniques ou benthiques, les cyanobactéries croissent en mer comme en eau douce ainsi que dans les eaux sur-salées des marais salants. Abondantes dans les milieux oligotrophes, certaines sont capables de coloniser les milieux pollués aérobies ou anaérobies. D'autres peuvent être toxiques (*Anabaena*, *Microcystis*) pour l'animal et pour l'Homme qui les consomment. Cette ubiquité est liée à leur grande faculté d'adaptation. Elles ont développé un arsenal de stratégies physiologiques, métaboliques, écologiques qui leur confère une plasticité écologique extrême. Ces stratégies adaptatives leur permettent de survivre dans des conditions environnementales à priori non favorables grâce au maintien de l'équilibre entre les exigences de base de la vie (eau, énergie, éléments nutritifs) et l'optimisation des processus de la vie (croissance, reproduction et survie (minimiser les pertes)). Nous pouvons ainsi citer comme stratégies de résistance : leur composition pigmentaire, leur mobilité, la diazotrophie, la présence d'akinètes (cellules spécialisées de résistance) et enfin leur production toxinique.

I.1.b Les cyanobactéries toxiques marines

Tous les ordres composant les cyanobactéries d'eau douce, de loin les plus étudiées, renferment des genres toxinogènes. A ce jour, ce sont les ordres des Nostocales et des Oscillatoriales qui sont les plus impliqués. Les principaux genres connus pour leur capacité à produire des toxines sont *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Oscillatoria* et *Planktothrix* (figure 17). Une quarantaine d'espèces connues sécrètent ou contiennent des cyanotoxines qui sont généralement des neurotoxines pouvant affecter mortellement divers animaux et l'Homme (Carmichael *et al.*, 1997).

Bien que très nombreuses, les cyanobactéries marines sont beaucoup moins étudiées quant à leur potentiel toxinogène alors qu'elles mériteraient largement une attention croissante afin d'en évaluer le risque.

Benthiques ou pélagiques, les genres *Lyngbya* et *Trichodesmium* sont en revanche bien étudiés du fait de leur importance dans les mers des régions tropicales (Hoffmann, 1999 ; Golubic *et al.*, 2009).

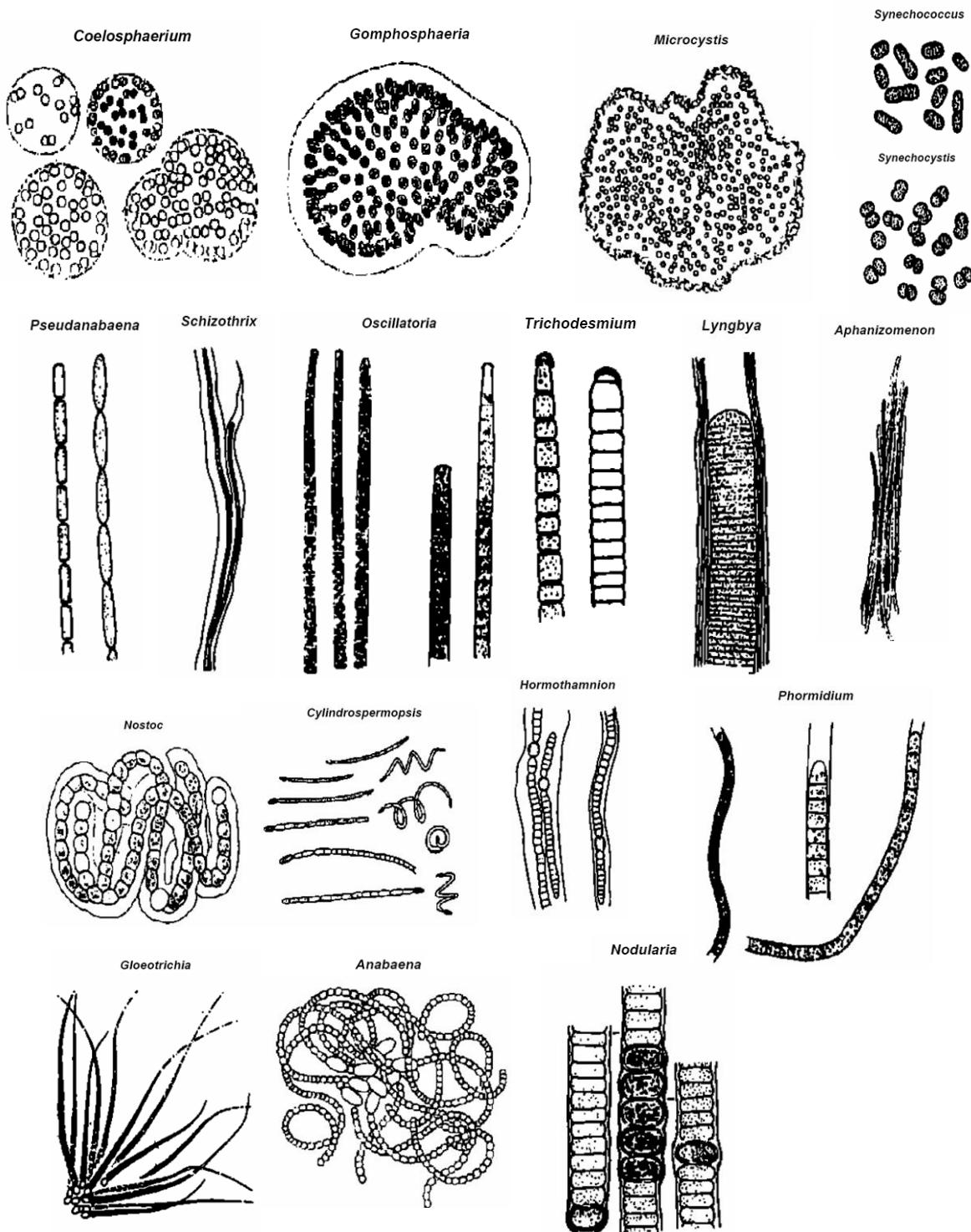


Figure 17 : Diversité de formes parmi les genres de cyanobactéries toxiques les plus fréquemment rencontrés
(D'après Lawton L. et al., 1999).

Lyngbya majuscula

Une des cyanobactéries marines les plus étudiées est certainement *Lyngbya majuscula*, (photos 9 et 10). C'est une filamentuse benthique des régions tropicales dont la fréquence et la taille des efflorescences augmentent de manière inquiétante ces dernières années, particulièrement dans la baie de Moreton dans le Queensland australien (Dennison *et al.*, 1999 ; Watkinson *et al.*, 2005 ; Roelfsema *et al.*, 2006). Plus de 70 composés bioactifs ont été identifiés chez *L. majuscula* comme par exemple l'aplysiatoxine, la debromoaplysiatoxine, la lyngbyatoxine et l'antillatoxine. Les activités biologiques de ces substances sont très variées et se traduisent par des irritations cutanées, oculaires ou respiratoires (Osborne *et al.*, 2001). Les dommages sur la santé humaine sont multiples au regard de la variété de toxines produites par cette cyanobactérie. Les intoxications rapportées sont provoquées par contact direct ou par inhalation d'aérosols.



9



10

Photos 9 et 10: Mattes de *Lyngbya majuscula* sur un tombant récifal (au premier plan) et en phase de récolte.

Outre les intoxications liées aux nombreuses toxines que cette cyanobactérie est capable de synthétiser, ses proliférations massives peuvent affecter considérablement l'écosystème marin en provoquant l'asphyxie de la faune environnante par anoxie.

Enfin, *L. majuscula* a été fortement suspectée par Randall (1958) d'être une des sources des toxines impliquées dans le phénomène ciguatérique. Cette cyanobactérie a en effet été identifiée dans le contenu digestif de nombreux poissons ciguatoxiques dont les *Acanthurus* (Dawson *et al.*, 1955). À l'origine des recherches sur la ciguatéra, *L. majuscula* a été considérée comme l'un des précurseurs benthiques contribuant à la composition du panel de toxines contaminant les poissons et provoquant cette intoxication (Halstead, 1965).

Trichodesmium spp.

Trichodesmium est une cyanobactérie non-hétérocystée diazotrophe qui domine périodiquement les communautés phytoplanctoniques des eaux oligotrophes tropicales. Pour ces deux raisons, elle est largement étudiée d'un point de vue biogéochimique afin d'évaluer son rôle dans le cycle de l'azote et du carbone des océans (Carpenter *et al.*, 1993, 2004 ; Capone *et al.*, 1997 ; Levitan *et al.*, 2010).

Comme précédemment mentionné, il a été démontré (i) la présence de composés neurotoxiques paralysants dans des échantillons de *Trichodesmium* (Rörig *et al.*, 1998 ; Hawser, 1991 ; Hawser and Codd, 1992 ; Hawser *et al.*, 1992;) ainsi (ii) qu'un lien fort probable entre la production par *Trichodesmium* de substances neurotoxiques de type CTXs et la contamination des thazards (*Scomberomorus commerson*) par de telles toxines (Endean *et al.*, 1993 ; Hahn and Capra, 1992). Etant donné l'intérêt de cette cyanobactérie, l'étude de la nature de la toxicité de *Trichodesmium* fait l'objet d'une section en fin de ce chapitre 2.

De nombreux genres de cyanobactéries sont ubiquistes des eaux douces, eaux saumâtres ou des océans, l'étude de leur toxicité associée à leurs risques avérés en eau douce, nous permet de penser qu'elles peuvent présenter un risque potentiel dans les écosystèmes marins (Gugger *et al.*, 2005 ; Stewart *et al.*, 2006 ; Cadel-Six *et al.*, 2007 ; Wood *et al.*, 2007).

I.1.c Les facteurs de prolifération - stratégie de résistance

Les cyanobactéries naturellement présentes peuvent dans certaines circonstances favorables à leur développement se multiplier rapidement. Ce phénomène est appelé efflorescence, fleur d'eau ou encore *bloom* en anglo-saxon. Suivant les espèces, une efflorescence peut apparaître et disparaître très vite lors de conditions favorables changeantes. C'est dans ces conditions de fort développement de biomasse que les cyanobactéries toxiques peuvent provoquer des effets délétères sur la faune environnante ou la santé humaine. La dynamique des populations est difficile à caractériser en l'état actuel des connaissances scientifiques. Seul un suivi régulier des paramètres environnementaux et des caractéristiques des populations cyanobactériennes pourrait permettre de l'évaluer.

Mais de manière générale, quelles sont les conditions nécessaires à ces développements parfois extraordinaires ?

I.1.c.1 *Conditions favorables*

Trois facteurs principaux influencent les proliférations cyanobactériennes :

L'eutrophisation. Un *bloom* de cyanobactéries n'est pas en soit une pollution, il peut constituer une réponse naturelle à un phénomène d'eutrophisation. D'importants enrichissements de l'environnement en éléments nutritifs (diverses formes azotées et/ou phosphatées) sont reconnus pour être un des facteurs les plus favorisants. Ces apports sont souvent liés aux activités humaines (lessivage des sols agricoles, urbanisation épurant mal ses eaux...).

Facteurs physico-chimiques favorables. La lumière, la température, la salinité et le pH ont des valeurs optimales et propres à une cyanobactérie donnée. Plus ces valeurs sont proches de l'optimum, plus, à priori, la croissance de la population sera grande.

La stratification de la colonne d'eau. Avant et pendant le bloom, la colonne d'eau se stratifie grâce à une diminution de l'hydrodynamisme local. La stratification du milieu favorisée par des eaux calmes est caractéristique dans les lacs et rivières. Ce même phénomène est également observé lors des efflorescences de *Trichodesmium* en milieu marin (Rodier and Le Borgne, 2008 ; 2010). Les cyanobactéries pélagiques se positionnent dans la colonne d'eau grâce à la production de lipides ou de vacuoles gazeuses, afin de bénéficier de conditions physico-chimiques (lumière, turbulence, salinité...) optimales.

I.1.c.2 Conséquences biologiques et écologiques des efflorescences

Le développement soudain, en masse, de ces organismes peut avoir différentes conséquences sur leur environnement proche et provoque divers effets négatifs. Ainsi la surabondance de ces populations crée des impacts liés à :

- L'ombrage.** La biomasse produite inhibe les conditions optimales de luminosité pour les autres espèces et peut causer ainsi leur mort.
- La dominance.** La biodiversité de l'écosystème est fortement déséquilibrée. La population dominante inhibe le développement des autres populations de la communauté phytoplanctonique.
- L'anoxie.** Les fortes consommations en O₂ de cyanobactéries appauvriscent le milieu. Ces conditions d'anoxie peuvent être fatales aussi bien pour les végétaux que pour les animaux. Mais cette consommation massive d'O₂ peut être également une conséquence indirecte des efflorescences, causée par la dégradation de ces grandes quantités de matière organique par les bactéries.

Les efflorescences peuvent interférer de manière mécanique et/ou chimique sur l'écosystème, par exemple l'apport soudain et massif d'élément comme l'ammoniaque est toxique pour de nombreux organismes.

Enfin, certaines espèces sont capables de produire lors de telles proliférations des cyanotoxines en quantités suffisantes pour constituer un risque pour les humains et la faune.

I.1.d Les cyanotoxines

Les cyanotoxines sont des métabolites secondaires. Ce sont en majorité des peptides cycliques ou des alcaloïdes. Les cyanotoxines décrites dans cette section sont, à l'exception des saxitoxines, toutes produites uniquement par les cyanobactéries.

Les phycotoxines d'eau douce et d'eau saumâtre sont majoritairement des cyanotoxines produites par les cyanobactéries tandis que la production des phycotoxines marines est, à ce jour, majoritairement attribuée aux microalgues, régulièrement associées aux épisodes toxiques entraînant l'interdiction de commercialisation des coquillages (cf. ch.1.I.1).

Lors d'un phénomène d'efflorescence, plusieurs espèces de cyanobactéries pouvant coexister, il est possible qu'une prolifération aboutisse à la production concomitante de plusieurs cyanotoxines (tableau 6).

Tableau 6 : Espèces de cyanobactéries potentiellement toxiques et des toxines associées ayant déjà été observées en France (AFSSA et AFSET, 2006).

Cyanobactéries	Cyanotoxines
<i>Anabaena circinalis</i>	Anatoxines, saxitoxines, microcystines
<i>Anabaena plantonica</i>	Anatoxine-a
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	Anatoxine-a, saxitoxines
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	Cylindrospermopsine, saxitoxines
<i>Lyngbya gracilis</i>	Debromoaplysiatoxines
<i>Microcystis aeruginosa</i>	Microcystines
<i>Oscillatoria sp</i>	Anatoxine-a
<i>Planktothrix agardhii</i>	Microcystines
<i>Planktothrix rubescens</i>	Microcystines
<i>Raphidiopsis sp.</i>	Cylindrospermopsine
<i>Woronichinia naegeliana</i>	Anatoxines-a

I.1.d.1 Les différentes classes

Les cyanotoxines sont classées selon les organes cibles, les moins toxiques étant les dermatotoxines et les plus toxiques les hépatotoxines et les neurotoxines (AFSSA et AFSET, 2006).

I.1.d.1.a Dermatotoxines

Les dermatotoxines sont des toxines irritantes dont les affections sont majoritairement cutanées : elles touchent principalement la peau et les muqueuses (dermites ou dermatose). Intracellulaires, elles sont hydrosolubles, très stables et très variables. Il en existe deux types :

- Les **alcaloïdes dermatotoxiques** uniquement identifiés dans les cyanobactéries marines : aplysiatoxine, debromoaplysiatoxine et lyngbyatoxine-a,
- Les **lipopolysaccharides**, constitutifs de la paroi cellulaire et présents chez toutes les espèces de cyanobactéries, qui pourraient également être responsables d'effets gastro-intestinaux en cas d'ingestion ainsi que d'irritation et d'inflammation des voies aériennes supérieures.

I.1.d.1.b Hépatotoxines

Les hépatotoxines affectent principalement le foie, les reins et les intestins pouvant être des cibles secondaires. Ce sont les toxines les plus fréquemment rencontrées lors de proliférations cyanobactériennes. On distingue trois grandes familles qui sont : les microcystines, les nodularines ou les cylindrospermopsines (Mazur-Marzec, 2006 ; AFSSA et AFSET, 2006) (pour revue : Gago-Martinez A., 2007 ; Welker, 2008 ; Furey *et al.*, 2008).

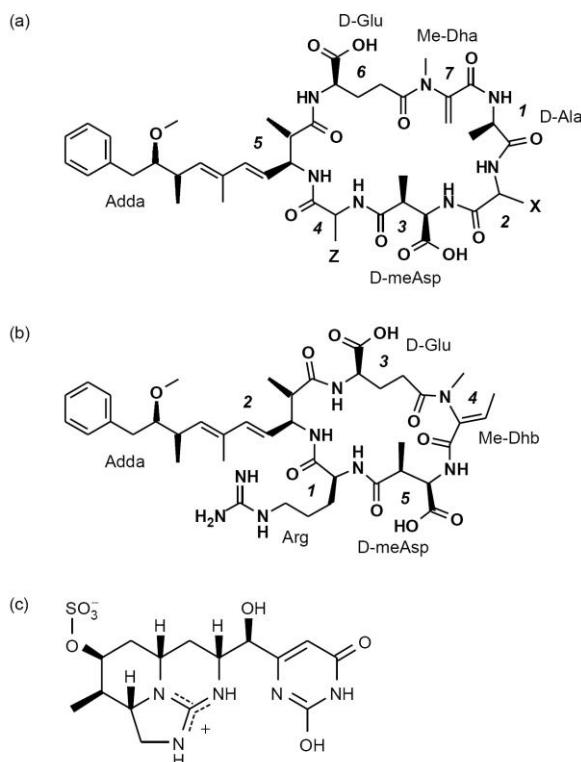


Figure 18 : Structures des microcystines (a), des nodularines (b), et de la cylindrospermopsine(c) (Extrait de Welker, 2008).

Microcystines et nodularines

Les microcystines, heptapeptides cycliques, constituent une famille de toxines composée de près de 80 variantes de masse moléculaire comprise entre 800 et 1 100 daltons (Da). Les congénères se différencient par la substitution de deux acides aminés sur la structure chimique de base (figure 18a). Les microcystines ont été identifiées dans les souches des genres *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Planktothrix*, *Nostoc*, *Hapalosiphon* et *Anabaenopsis*.

Les nodularines sont des peptides cycliques de cinq acides aminés. On distingue 9 variantes en fonction de la position des méthylations (figure 18b). Elles sont très proches des microcystines, de la même gamme de poids moléculaire et de propriétés physico-chimiques similaires. Elles sont produites majoritairement par le genre *Nodularia*.

Les microcystines et les nodularines sont solubles dans l'eau et très stables dans l'environnement. La demi-vie des microcystines est de l'ordre de 2 à 4 jours (Jaeg, 2007). La DL₅₀ est très différente en fonction du type de microcystine variant, en injection i.p., de 50 µg / kg pour la MC-LR à 800 µg / kg pour la MC-RR (Jaeg, 2007) (tableau 7).

La toxicité des microcystines et des nodularines est complexe et s'exprime différemment en fonction de leur structures et de la dose ingérée. Certaines d'entre elles entraînent à forte dose la mort cellulaire alors qu'à faible dose, elles provoquent plutôt une prolifération cellulaire (Gago-Martinez, 2007).

Cylindrospermopsine

La cylindrospermopsine est un alcaloïde de 415 Da (figure 18c). Il en existe 2 congénères, un non toxique et un toxique avec une DL_{50} en injection i.p. chez la souris de 2,1 mg / kg. C'est une molécule très polaire et soluble dans l'eau. Elles sont majoritairement produites par *Cylindrospermopsis raciborskii*.

Cette molécule est connue pour inhiber la synthèse des protéines de façon non spécifique. Les organes les plus touchés sont les reins et le foie. Cependant d'autres organes peuvent être affectés comme les poumons, les glandes surrénales, l'estomac, le pancréas et les intestins (Welker, 2008).

I.1.d.1.c Neurotoxines

Les neurotoxines ciblent la jonction neuromusculaire avec un mode d'action spécifique à chaque famille. Ainsi, basées sur leurs activités, trois classes majeures de neurotoxines ont été définies : l'anatoxine-a, l'anatoxine-a (S) et les saxitoxines et dérivés (figure 19). Jusqu'à présent, elles n'étaient connues qu'en milieu d'eau douce (pour revue Aráoz *et al.*, 2009).

Anatoxine-a

L'anatoxine-a (AnTX-a) est un alcaloïde à fonction amine secondaire de 165 Da, soluble dans l'eau, peu stable et rapidement dégradé dans l'environnement. L'homoanatoxine (HAnTX-a), forme méthylée de l'AnTX-a, a un poids moléculaire de 179 Da ; ses propriétés chimiques sont quasiment les mêmes que celles de l'AnTX-a (figure 19) (James *et al.*, 2007). Chez la souris, leur DL_{50} est de 250 µg / kg en injection i.p. et de plus de 5 000 µg/kg par voie orale (tableau 7).

L'AnTX-a et l'HAnTX-a sont des agonistes des récepteurs à l'acétylcholine. L'acétylcholine est le neurotransmetteur principal de la jonction neuromusculaire. La cyanotoxine entraîne une dépolarisation de la jonction neuromusculaire (blocage de la transmission de l'influx au niveau des synapses) qui se traduit par des fasciculations musculaires, des convulsions et l'apparition d'une détresse respiratoire pouvant engendrer la mort. L'acétylcholine subit normalement une dégradation permanente par l'acétylcholinestérase qui ne peut en revanche dégrader l'AnTX-a, entraînant alors son accumulation. Ceci a pour conséquence l'apparition d'un syndrome cholinergique.

Ces deux neurotoxines sont produites par les genres *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermum*, *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Planktothrix* et *Raphidiopsis* pour l'AnTX-a et par *Oscillatoria*, *Anabaena*, *Raphidiopsis* et *Phormidium* pour l'HAnTX-a (Aráoz *et al.*, 2009). Ces deux toxines peuvent être simultanément produites par *Raphidiopsis mediterranea* (Namikoshi *et al.*, 2003) et par une souche axénique d'*Oscillatoria PCC 9029* (Aráoz *et al.*, 2005).

Anatoxine-a (S)

L'anatoxine-a(s) (AnTX-a(s)) est un ester de phosphate de 252 Da, instable aux pH alcalins et à la chaleur (figure 19). C'est un inhibiteur de l'acétylcholine estérase. Lors d'une

intoxication à l'AnTX-a(s), l'acétylcholine n'est plus suffisamment dégradée. Elle s'accumule et provoque une stimulation excessive des récepteurs cholinergiques. Les effets induits sont similaires à ceux qui sont observés avec l'AnTX-a (syndrome cholinergique) avec la particularité du symptôme d'hypersalivation (expliquant la lettre (s) d'AnTX-a(s)). L'AnTX-a(s) est cependant dix fois plus toxique pour l'animal que l'AnTX-a : sa DL₅₀ en injection i.p. chez la souris est de 20 µg / kg (tableau 7).

L'AnTX-a(s) est beaucoup moins fréquente que l'AnTX-a et l'HAnTX-a. Elle a été identifiée chez *Anabaena flos-aquae* (pour revue, James *et al.*, 2007).

Saxitoxine

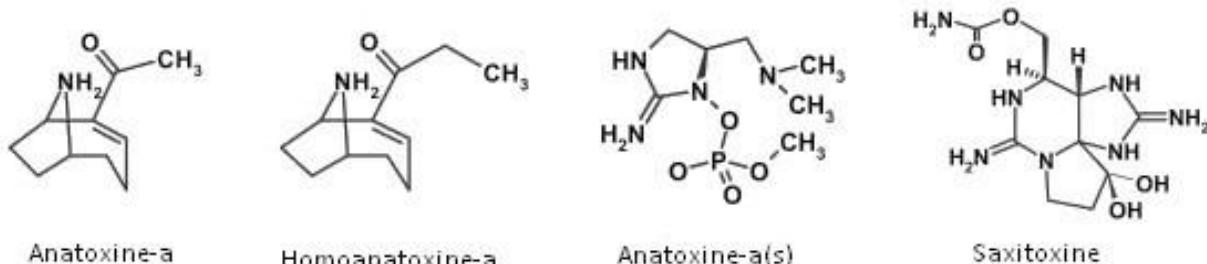
Les saxitoxines (STXs) sont les seules toxines produites à la fois par des dinoflagellés et des cyanobactéries. Elles sont responsables des IPFM (ou PSP) brièvement présentées précédemment (cf. ch.1.I.1.d).

Pour rappel, elles forment une famille de 25 variantes d'alcaloïdes à un noyau tétrahdropurique dont : les non-sulfatés (STX), les STXs avec un groupement sulfaté (gonyautoxines, GTX) ou les STXs avec deux groupements sulfatés (C-toxines). Leur poids moléculaire varie de 241 à 491 Da. Elles sont très stables dans l'eau (figure 19).

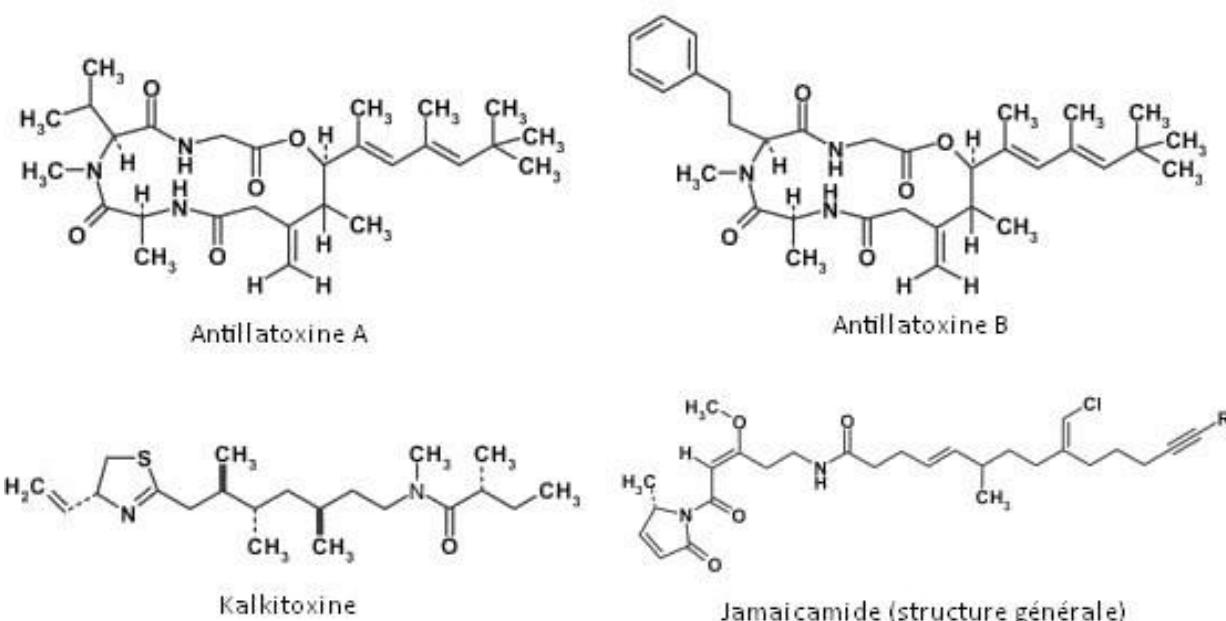
Les STXs se fixent au niveau du site 1 des CSSP et bloquent leur activité. Cette fixation a pour conséquence l'inhibition de la transmission nerveuse qui provoque l'apparition de symptômes de type paralysant. La STX est la plus puissante des toxines de cette famille avec une DL₅₀ chez la souris de 10 µg / kg (i.p.) (tableau 7).

Les STXs sont produites par les cyanobactéries d'eau douce *Aphanizomenon flos-aquae*, *Anabaena circinalis*, *Lyngbya wollei*, *Cylindrospermopsis raciborskii*.

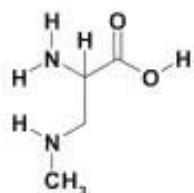
Alcaloïdes neurotoxiques chez les cyanobactéries d'eau douce



Lipopeptides neurotoxiques chez les cyanobactéries marines



Acide aminé neurotoxique cyanobactérien



L-β-N-methylamino-L-alanine (L-BMAA))

Figure 19 : Structure des neurotoxines (extrait d'Aráoz, 2009).

Enfin, de nouvelles cyanotoxines produites par les cyanobactéries marines sont décrites régulièrement et dont les risques potentiels pour la santé humaine ou animale ne sont pas

encore connus (antillatoxines, kalkitoxine, jamaicamides, BMAA ou β -méthylamino-L-alanine...) (figure 19) (Aráoz *et al.*, 2009).

Tableau 7 : Caractéristiques des principales cyanotoxines connues : nombre de congénères décrits, espèces sources et toxicité selon différents modes d'administration (i.v. : intra-veineux, i.p. : intra-péritonéal ; i.n. : intra-nasal) (d'après Codd, 2000 et Furey *et al.*, 2008 *in* Botana).

Cyanotoxines	Nombre	Espèce-sources	Toxicité DL ₅₀ (μ g/kg)			
			i.v.	i.p.	i.n.	orale
Microcystines	80	<i>Microcystis, Oscillatoria, Anabaena, Nostoc, Hapalosiphon</i>	-	25 - 150	36-122	5 000 - 10 900
Nodularines	9	<i>Nodularia</i>	-	200 - 2 000	-	4 400 - 6 900
Cylindrospermopsines	2	<i>Cylindrospermopsis, Aphanizomenon</i>	-	200 - 2 000	-	4 400 - 6 900
Anatoxine-a	2	<i>Anabaena, Oscillatoria, Microcystis, Phormidium, Aphanizomenon, Cylindrospermum</i>	< 100	375	2 000	> 5 000
Homoanatoxine-a	1	<i>Anabaena, Planktothrix</i>	-	250	-	> 5 000
Anatoxine-a(S)	1	<i>Anabaena</i>	-	20	-	-
Saxitoxines	> 20	<i>Aphanizomenon, Anabaena, Lyngbya, Cylindrospermopsis</i>	3,2 - 3,6	7,6 - 10,5	-	251 - 267
LPS	> 3	La plupart	-	-	-	-
Aplysiatoxine	2	<i>Lyngbya, Schizothrix, Oscillatoria</i>	-	-	-	-
Lyngbyatoxine	> 1	<i>Lyngbya</i>	-	-	-	-

I.1.d.2 Régulation de la production en cyanotoxines

Toutes les cyanobactéries ou les différentes souches d'une même espèce ne sont pas toxinogènes. La présence d'un genre réputé produire des cyanotoxines ne signifie pas nécessairement que les toxines seront présentes, car toutes les espèces constituant le genre n'ont pas la capacité de produire des cyanotoxines. Les espèces toxiques peuvent générer une souche qui possèdera (et exprimera) ou non les gènes pour la production de toxines. Selon la diversité du matériel génétique des souches toxiques, celles-ci peuvent générer des cyanotoxines de toxicité variable. Une même souche peut synthétiser plusieurs cyanotoxines pouvant rendre complexe la détection du panel de toxines si celles-ci appartiennent à des classes différentes (activités différentes) ou si leurs propriétés physico-chimiques diffèrent (notion de profil toxinique).

La plus grande partie des cyanotoxines produites s'accumule à l'intérieur des cellules (endotoxine) et le niveau de production semble être corrélé à la phase de croissance des cyanobactéries. A la fin de la période de sénescence, elles meurent et les cellules se lysent, provoquant le relargage des toxines dans le milieu environnant. Ainsi, pendant la phase d'installation de l'efflorescence, on retrouve très peu de toxines extracellulaires alors qu'en phase de déclin, la concentration de toxines extracellulaires augmente considérablement. Sachant que ces espèces sont souvent caractérisées par des efflorescences sans mesure régulière et rapprochée, il est difficile de mesurer les maxima de toxicité.

Selon certaines études, les proliférations de cyanobactéries sont rarement prédictibles et il n'y a pas de corrélation entre la biomasse de cyanobactéries et la quantité de toxines produites (Welker, 2008).

Des corrélations ont toutefois été observées entre la production toxinique et la croissance cellulaire, l'intensité lumineuse, la concentration en nutriments et en fer, l'effet du zooplancton et certains paramètres physico-chimiques du milieu (température et pH) (Sivonen and Jones, 1999).

I.1.d.3 Rôles des toxines

Différentes théories ont été proposées quant à la fonction des cyanotoxines. Plusieurs auteurs suggèrent que la production de ces métabolites serait le résultat d'un stress provenant de l'environnement. D'autres soutiennent que l'expression des gènes à l'origine de la production de ces toxines est constitutive et que la proportion synthétisée augmenterait avec la croissance de la souche considérée et par conséquent, indirectement avec les facteurs environnementaux. Les toxines auraient ainsi des fonctions régulatrices du métabolisme cellulaire. Enfin comme autre hypothèse, il est proposé que ces molécules puissent servir de facteurs favorisant le mutualisme avec d'autres espèces, ou à l'inverse, que ces toxines puissent procurer un avantage sélectif sur des espèces compétitrices. En effet ces toxines pourraient être produites dans le but d'éliminer des compétiteurs potentiels pour les ressources, ainsi que des prédateurs.

En conséquence, quelque soit leur origine, la production de ces toxines contribue à augmenter l'avantage compétitif des cyanobactéries dans le but d'atteindre la dominance de l'écosystème.

I.2 Les intoxications dues aux cyanobactéries

I.2.a Tableaux cliniques

En raison de la coexistence possible de plusieurs classes de toxines au sein d'une même efflorescence, les tableaux cliniques peuvent être complexes. Cependant, il est possible d'associer des symptômes spécifiques à chacune des 3 classes de cyanotoxines :

Dermatotoxines

Les personnes exposées aux dermatotoxines présentent un tableau clinique classiquement appelé « démangeaison du baigneur ». En plus des signes d'irritation cutanée (érythème, œdème), il est possible d'observer une atteinte des muqueuses oculaires et/ou nasales et lors d'inhalation, des troubles respiratoires voire des troubles digestifs (lésions irritatives buccales, gastro-entérite) parfois accompagnés de fièvre (de Haro, 2008). Mais globalement, les effets sur la santé de ces toxines sont moins bien établis que pour les deux autres classes de cyanotoxines.

Hépatotoxines

Les personnes exposées aux hépatotoxines présentent un tableau de type gastro-entérite avec apparition, dans les 3 à 5 h suivant l'ingestion de l'eau contaminée, de crampes abdominales, puis de vomissements et diarrhées. Le tableau s'améliore spontanément en 24 à 48 h, mais dans les cas les plus graves, une atteinte hépatique peut être observée, avec cytolysé hépatique (élévation des transaminases) potentiellement sévère, conduisant à l'insuffisance hépatocellulaire avec mise en jeu du pronostic vital.

Neurotoxines

Il existe un risque de paralysie musculaire pouvant atteindre les muscles respiratoires. Plusieurs cas de décès de chiens, d'oiseaux et de bétail ont été décrits, avec arrêt respiratoire, après ingestion d'eau contaminée ; les symptômes observés sont des vertiges, des tremblements, une suffocation, des convulsions et un opisthotonos (contraction généralisée du corps). L'apparition des symptômes peut être rapide avec arrêt respiratoire brutal quelques minutes seulement après l'ingestion d'eau contaminée (cas des animaux retrouvés morts au bord de l'eau) ou intervenir dans un délai de 6 à 24 h avec développement d'une bradypnée d'aggravation progressive. Chez l'Homme, des cas de céphalées parfois accompagnées de malaises et de troubles digestifs ont été rapportés (de Haro, 2008). Les intoxications humaines sont généralement dues à la consommation de mollusques filtreurs (coquilles St Jacques, moules) contaminés. Les symptômes provoqués par ces neurotoxines peuvent être difficiles à différencier de ceux provoqués par les CTXs, étant donnée la très forte variabilité individuelle observée lors des intoxications ciguatériques.

Quelque soit la cyanotoxine incriminée lors d'une intoxication, le traitement reste purement symptomatique.

I.2.b Incidence et nature des intoxications

Les cyanotoxines sont à l'origine de nombreuses intoxications mortelles chez les animaux domestiques et sauvages, et d'un nombre non négligeable d'intoxications chez l'Homme (pour revue : Kuiper-Goodman *et al.*, 1999 ; Falconer, 2005; AFFSA et AFSSET, 2006).

C'est en 1878 que Francis décrit le premier cas d'animaux de ferme (moutons, chevaux, chiens et cochons) morts intoxiqués par ingestion d'eau contaminée par *Nodularia spumigena* près du fleuve Murray en Australie du sud-ouest (Codd *et al.*, 1994).

Un des accidents les plus graves enregistrés s'est déroulé en 1996 au Brésil lors de l'utilisation d'eau en soins de dialyse. La contamination de l'eau par des hépatotoxines (microcystines et cylindrospermopsines) a provoqué la mort de 60 patients à la suite de graves affections hépatiques (Pouria *et al.*, 1998).

A ce jour, en France, aucune intoxication mortelle chez l'Homme n'a encore été recensée. Cependant, depuis l'année 2002, plusieurs décès de chiens ont été constatés sur les rives du Tarn, à la suite de l'ingestion d'eau contaminée par des cyanobactéries et/ou par des cyanotoxines (Gugger *et al.*, 2005 ; Silvano, 2005 ; Cadel-Six *et al.*, 2007). Cette mortalité canine suggère qu'il existe un risque sanitaire potentiel pour la population exposée lors d'activités nautiques.

Les voies d'expositions sont diverses : (i) par baignade, lors de la pratique de sports aquatiques, (ii) par ingestion d'eau contaminée par les cyanobactéries et/ou leurs toxines (le plus fréquent), (iii) lors de la consommation d'organismes ayant accumulé des toxines, enfin (iv) l'inhalation de l'écume, plus rare, pourrait représenter un risque pour les personnes à proximité de l'efflorescence.

L'AFSSA et l'AFSSET ont mené conjointement une large étude faisant l'état des lieux des risques liés aux cyanotoxines en France (AFSSA et AFSSET, 2006). Il en ressort que pour une seule des toxines, la microcystine LR : le risque lié à la présence de cette hépatotoxine dans les eaux destinées à la consommation humaine est considéré « négligeable ».

Les risques liés aux autres cyanobactéries marines ou d'eau douce sont encore difficiles à estimer tant les rapports restent sporadiques. En effet, les études concernant les cas d'intoxications ne sont souvent menées que par intérêts affectifs (chiens) ou économiques (élevage, aquaculture). Les intoxications recensées sont donc à priori sous estimées (sous-déclaration des intoxications chez les animaux sauvages).

Les intoxications humaines directes restent heureusement faibles probablement par évitement des zones visiblement contaminées (accumulation des fleurs d'eau en bord de rivage). Par contre, en ce qui concerne les intoxications indirectes, l'évaluation du risque n'est pas aisée en raison du temps de latence dans le phénomène d'assimilation et d'accumulation dans la chaîne alimentaire.

C'est cet aspect des intoxications par voie indirecte que nous allons tenter d'élucider avec entre autre la recherche et l'étude de l'agent causal, dans le but d'évaluer le risque réel ou potentiel que les cyanobactéries engendrent.

A ce jour, en Nouvelle-Calédonie, aucun signalement d'intoxication due aux cyanobactéries marines n'a été formellement établi.

I.3 La chaîne trophique et les vecteurs de toxicité

Les cyanobactéries d'eau douce ou marine ont peu de prédateurs connus, plus pour des raisons de méconnaissances que de réalité de fait : les études commencent à peine à se développer sur le sujet (Cruz-Rivera and Villareal, 2006). Cependant, on peut citer certaines espèces de zooplancton, de poissons ou de mollusques pouvant être considérées comme des vecteurs potentiels de toxicité.

I.3.a Le zooplancton

Les prédateurs connus des cyanobactéries appartiennent majoritairement au zooplancton qui constituerait un second maillon de la chaîne de transfert pour une éventuelle toxicité. *Planktothrix rubescens*, cyanobactérie d'eau douce et productrice de microcystines, a été retrouvée dans le tractus digestif d'un de ses prédateurs connus, les daphnies. Les cyanobactéries du genre *Trichodesmium* sont des proies pour deux espèces identifiées du zooplancton, *Miracia efferata* et *Macrosetella gracilis*, qui ne sont pas affectées par la toxicité de la cyanobactérie (O'Neil and Roman, 1992 ; O'Neil, 1998 ;). Ainsi, il semble que certains prédateurs comme les mésobruteurs (taille de 0,5 à 2 cm), épiphytes des populations cyanobactériennes, aient acquis une forme de résistance vis-à-vis du système de défense de leur hôte (Cruz-Rivera and Villareal, 2006). La chaîne de transfert et l'intégration des cyanotoxines dans la chaîne trophique pourraient se faire par ces différents organismes de prédation.

I.3.b Les poissons

Comme nous l'avons déjà cité précédemment, *L. majuscula* a été retrouvé dans l'alimentation de divers poissons récifaux (Dawson *et al.*, 1955). Certains de ces poissons herbivores ingèrent directement ces cyanobactéries benthiques pouvant constituer de véritables prairies de gazon denses. Cependant, à priori, au vue de la faible qualité nutritionnelle que peut apporter ces cyanobactéries, elles ne peuvent être considérées comme élément principal de l'alimentation de ces poissons (Capper *et al.*, 2005 ; 2006).

Il est intéressant également de mentionner les mullets (Mugilidés) : ces poissons planctonophages se nourrissent en surface où il y a accumulation d'organismes planctoniques. Ils ingèrent ainsi d'importantes quantités de biomasse de *Trichodesmium* lors des

efflorescences. Les poissons planctonophages, prédateurs du zooplancton, pourraient ainsi constituer un autre maillon de la chaîne trophique.

I.3.c Les bénitiers

De nombreux cas d'intoxications provoquées par la consommation de bénitier ont été rapportés, particulièrement dans le Pacifique (Bagnis, 1967). Halstead nomme ce type d'intoxication « *Tridacna shellfish poisoning* » dont les symptômes incluent des perturbations gastro-intestinales et de coordinations (Halstead, 1965). En 1976, Kanno entreprend l'étude de la toxicité des bénitiers et met en évidence comme Bagnis en 1967, des composés toxiques, sans déterminer le type de toxicité. Enfin, la présence de STXs dans *Tridacna crocea* a été associée à des efflorescences de dinoflagellés du genre *Pyrodinium* à Palau et *Alexandrium* à Taïwan (Hwang, 2003). Bien que ces organismes filtreurs soient des accumulateurs potentiels de toxines, leur toxicité reste encore à élucider (nature toxinique, source intrinsèque...).

A travers l'étude menée à Lifou, nous souhaitons mettre en évidence (i) le type de toxicité de ces bénitiers et (ii) le lien potentiel existant entre la toxicité de ces organismes marins et les cyanobactéries qui se développent de manière importante dans la même zone récifale.

II. Etudes écotoxicologiques de Hunëtë à Lifou

II.1 Introduction

L'ensemble de l'étude à laquelle j'ai participé lors de mon intégration dans l'équipe a fait l'objet d'une publication, Laurent et al. (2008).

II.1.a Alerte sanitaire - Bilan épidémiologique

De 2001 à 2004, les habitants de la tribu de Hunëtë (environ 300), importants consommateurs de produits de la mer, ont été gravement touchés par des intoxications ciguatériques. L'étude épidémiologique rapporte trente cas d'intoxications principalement par consommation de poissons herbivores, perroquet (Scaridés), et molluscivores, bec de cane (Lethrinidés), mais aussi de bénitiers (mollusques filtreurs) pêchés dans la zone de pêche lagunaire de la tribu (tableau 8). Lors de l'alerte sanitaire, les habitants avaient déclaré que les crustacés pêchés dans la zone étaient également toxiques.

Tableau 8 : Espèces de poissons ayant provoqué des intoxications ciguatériques relevées par l'étude épidémiologique.

	Total	Nombre d'intoxication	
		Zone toxique	Zone non toxique
Perroquet	15	11	4
Bec de cane	7	5	2
Petit Napoléon	2	2	0
Dawa	2	2	0
Rouget	1	1	0
Loche saumonée	1	0	1
Bénitier	2	2	0

Le tableau clinique décrit est typique des intoxications ciguatériques classiques avec des symptômes de type neurologique (fourmillements, ataxie, paresthésie) et gastro-intestinal (vomissement, diarrhée) accompagnés de symptômes particuliers comme la brûlure de la bouche et de la gorge quelques minutes seulement après le début du repas. La population a noté également l'inefficacité des remèdes traditionnels utilisés de manière efficace habituellement.

Ce sont (i) la sévérité des symptômes ciguatériques accompagnés de symptômes annexes (brûlure de la bouche et de la gorge), (ii) le nombre important de cas d'hospitalisation (30%), (iii) l'inefficacité des médicaments traditionnels et (iv) les organismes marins impliquées (poissons herbivores, molluscivores et les bénitiers) inhabituels dans les cas de ciguatéra

classique (plutôt poissons ichtyophages en Nouvelle-Calédonie) qui font de cette intoxication une ciguatéra atypique.

II.1.b Zonation

Les habitants ont désigné de manière relativement précise deux zones où la majeure partie des organismes ayant provoqué les intoxications avait été pêchée : Managite et Keij, regroupées par la suite au sein d'une même zone qualifiée de « ZT » (ZT) pour faciliter l'approche expérimentale (figure 20).

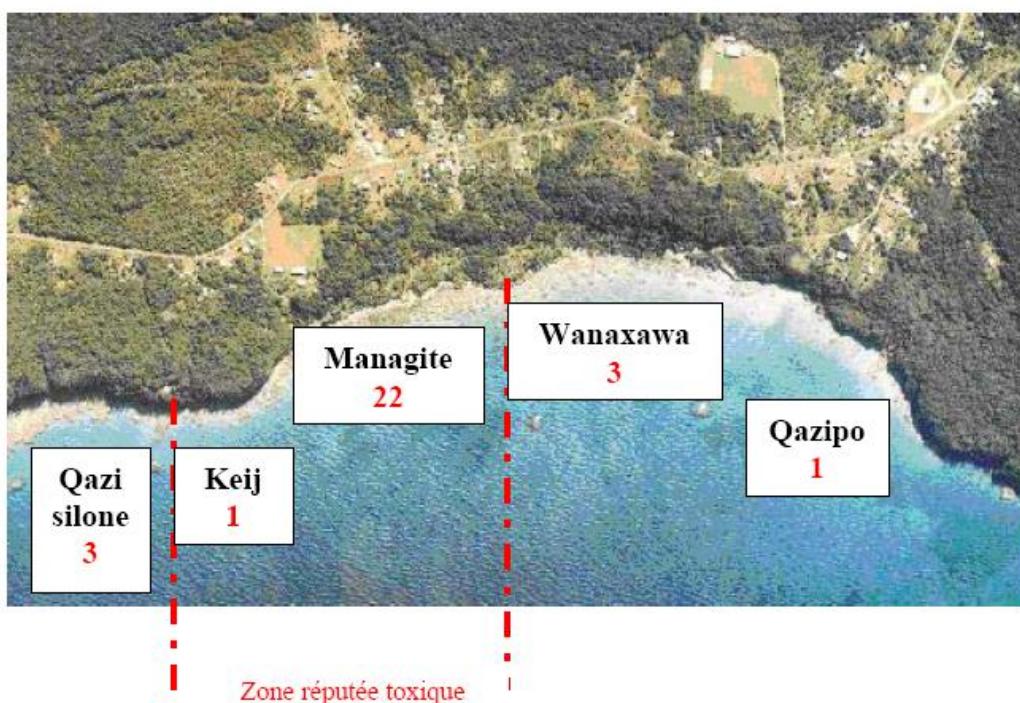


Figure 20 : Carte de la zone de pêche des habitants de la tribu de Hunëtë et nombre de cas d'intoxications par zone selon l'étude épidémiologique.

II.1.c Suivi écotoxicologique

II.1.c.1 Données antérieures et suivi environnemental

Au niveau de la ZT, une rampe de mise à l'eau a été construite à travers le récif soulevé. D'après les témoignages recueillis auprès du chef du clan des pêcheurs, en 1999, la zone a été affectée par la construction de cette rampe et de sa route d'accès. Les pluies ont drainé vers le récif les substrats détritiques coralliens utilisés pour le revêtement des routes. Un creusement du récif frangeant avait été nécessaire pour obtenir un accès à la pleine eau et visiblement, cette zone a été dégradée. Cet effet a ensuite été accentué lors du cyclone Erica en mars 2003 : les pluies diluviales associées au fort hydrodynamisme ont été un facteur aggravant la fragilité du corail.

Localement, des éléments exogènes détritiques (batteries et divers déchets) sont observés (photos 11 et 12), témoins de la présence d'un ancien « dépotoir marin ».



11



12

Photos 11 et 12 : Vues sous-marines de la zone située au pied de la mise à l'eau.

Au pied de cette zone, le corail est fortement dégradé et est recouvert de gazon cyanobactérien, véritable tapis noir recouvrant les coraux branchus morts entassés entre des blocs madréporaires ; l'espèce majoritaire a été identifiée comme étant *Hydrocoleum lyngbyaceum*. Par ailleurs, il est remarquable de noter l'absence de dinoflagellés ciguatoxinogènes.

La comparaison entre la ZT et les zones alentours met en évidence une très faible densité de macroalgues dans cette zone ainsi que l'absence quasi-totale d'holothuries, par rapport à la zone réputée non toxique (ZNT) qui est apparue riche et diversifiée tant en espèces benthiques que pisciaires.

II.1.c.2 Suivi toxicologique

Des analyses toxicologiques d'échantillons d'*H. lyngbyaceum*, de bénitiers et de poissons prélevés dans la ZT ont été effectuées. Ils indiquent :

- 1) Une toxicité de type CTXs dans les extraits liposolubles d'*H. lyngbyaceum* et de bénitiers qui a été mise en évidence suite à des analyses avec les tests souris, de cytotoxicité, de RBA et des études neurophysiologiques,
- 2) Une toxicité de type paralysante dans les extraits hydrosolubles d'*H. lyngbyaceum* (test souris) et de bénitiers (test souris et études neurophysiologiques), qui suggère la présence de toxines paralysantes de type AnTX-a ou STXs,
- 3) Une toxicité dans la chair et le foie de poissons de type CTXs (test souris) dans les extraits liposolubles versus une absence de toxicité dans les extraits hydrosolubles,
- 4) La présence d'un pic de rétention proche de celui de la P-CTX-3C dans des extraits purifiés de bénitiers (analyses chromatographiques en HPLC), qui suggère la présence de composés de type CTXs ou CTXs-like dans les bénitiers.

II.2 Matériels et méthodes

II.2.a Site d'étude

II.2.a.1 Présentation

La Nouvelle-Calédonie ($21^{\circ}30' S$, $165^{\circ}30' E$) est constituée de la Grande Terre, et des îles Loyautés (figure 21). La grande terre est bordée par une couronne récifale d'environ $8\,000\ km^2$, large de 100 à 10 000 m qui limite un lagon d'environ $20\,400\ km^2$. Les Loyautés sont, quant à elles, une partie émergée d'une ride située en bordure de la zone de collision de la plaque australienne avec la plaque pacifique. Elles s'étendent sur plus de 1 000 km selon un alignement SE / NO (entre $18^{\circ}S$ et $25^{\circ}S$) avec du Nord au Sud, Ouvéa, Lifou, Tiga et Maré. Ce sont d'anciens récifs coralliens soulevés séparés de la Grande-Terre à l'ouest par le bassin des Loyauté dont la profondeur varie de 2 000 à 2 500 m. Les îles Loyauté sont elles-mêmes séparées les unes des autres par des fonds variant entre 1 500 et 1 700 m.



Figure 21 : Situation de la Nouvelle-Calédonie et de Lifou

Lifou est la plus grande des îles Loyauté avec une superficie de $1\,207\ km^2$ (elle est comparable à la Martinique). Cet atoll surélevé émerge à 104 m et sa population est de 8 627 habitants (recensement 2009). Lifou désigne à la fois l'île, l'aire coutumière de Drehu et une commune, chef-lieu de la Province des îles Loyauté. L'aire coutumière est subdivisée en trois districts (Wetr, Gaica et Lössi) qui regroupent eux-mêmes 37 tribus.

Comme ses voisines, Lifou est constituée de roches calcaires massives d'origine corallienne qui se soulèvent progressivement au cours du temps. Elle présente un large plateau central entouré par une couronne de falaises correspondant à l'ancienne barrière récifale. Très calcaire et donc poreuse, elle est dépourvue de cours d'eau mais renferme une importante lentille d'eau douce en profondeur qui est accessible par des « trous d'eau ». De nombreuses résurgences d'eau douce sont visibles tout le long de la côte, ces apports d'eau douce influençant notablement le biotope où ils se reversent.

L'écosystème récifal

De manière générale, l'état des récifs coralliens est considéré en « bonne santé » par les organismes de surveillance (programme Ifrecor, CRISP). Cependant, localement, on peut observer des zones dégradées par l'activité humaine ou par les aléas climatiques (cyclone, tsunami...) voire par d'autres pressions naturelles comme les *Acanthaster*. Ces dernières restent heureusement encore limitées. De nombreuses constructions d'infrastructures le long du littoral calédonien en général se sont faites par dragages ou remblais détruisant de nombreux hectares de côte, comme ce fut le cas ponctuellement dans la tribu de Hunëtë.

D'autre part, le blanchissement des coraux a frappé la Nouvelle-Calédonie en 1995 / 1996, du fait d'une augmentation de la température des eaux ; la situation semble stabilisée.

Enfin, il est difficile de mesurer avec certitude les différents impacts auxquels est soumis le récif plus localement (pollution domestique, prélèvements de coraux ou impact du tourisme).

La zone de pêche de la tribu de Hunëtë, zone incriminée

L'étude réalisée est située sur la zone traditionnelle de pêche de la tribu de Hunëtë. Elle se situe au nord-ouest de Lifou dans le district de Wetru au nord d'Easo (nord de la Baie de Santal). La zone de pêche, côtière, au pied de la tribu est constituée du récif soulevé. Ce plateau corallien est fait de grands dômes, sur fond dur de sable moyen et débris grossiers. La profondeur est de 50 cm à 5 m. La côte présente des renfoncements voire grottes, là où la mer a creusé le platier soulevé. Ces découpes ont pour conséquence la création de petites cuvettes caractérisées par une forte houle.

II.2.a.2 Plan d'échantillonnage

Dix-huit points d'échantillonnage, répartis entre la ZT et la ZNT définies antérieurement, ont été retenus, qui se répartissent selon :

- Trois transects perpendiculaires à la côte par zone : n°1, 2 et 3 pour la ZNT et n°4, 5 et 6 pour la ZT,
- Trois transects transversaux / transect perpendiculaire, distants d'environ 50 m, correspondant à 3 points d'éloignement de la côte : A, B et C respectivement (figure 22).

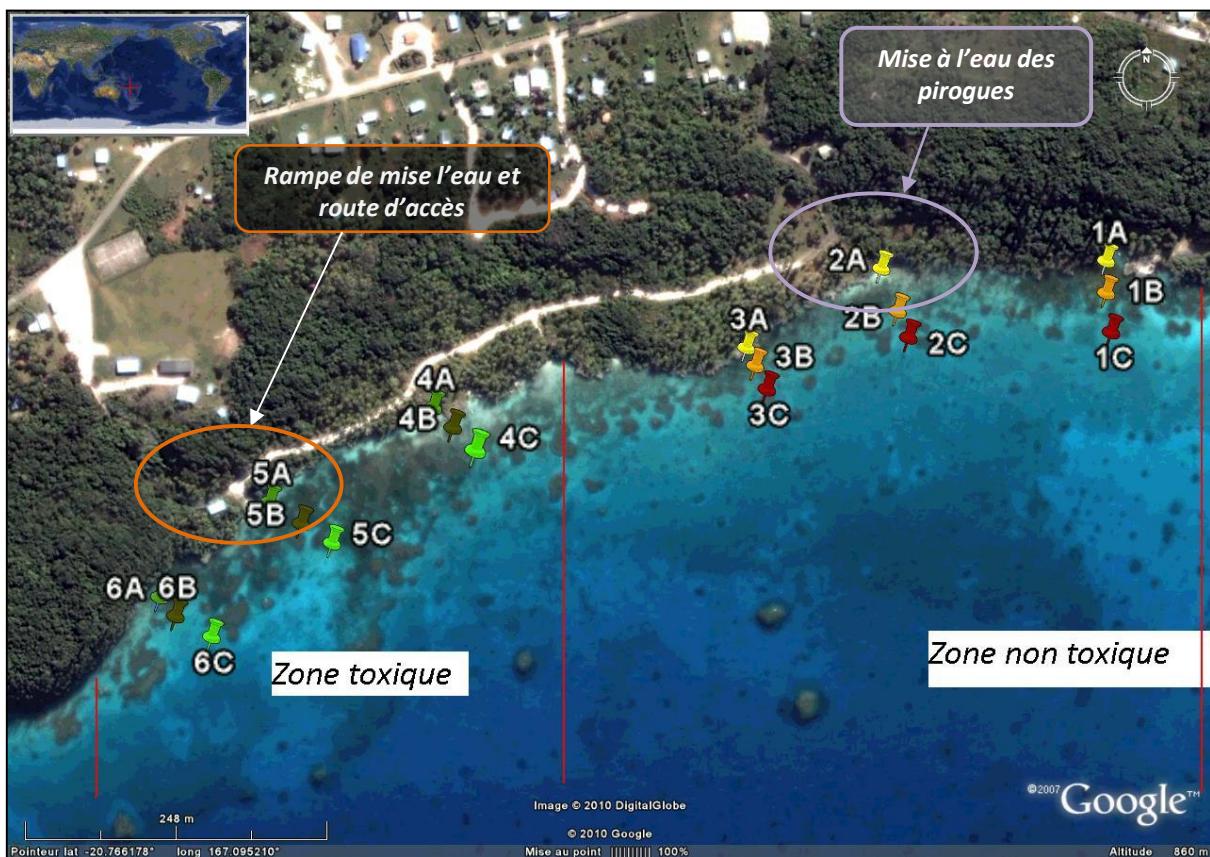


Figure 22 : Vue aérienne de la zone de pêche de la tribu de Hunêté à Lifou, zonation des prélèvements : 6 transects de A à B, perpendiculaires à la côte et 3 transects de 1 à 3 parallèles à la côte définissant 18 points de prélèvements.

Les caractéristiques (profondeur et coordonnées géographiques) de ces 18 points d'échantillonnage sont présentées dans le tableau 9.

II.2.b Prélèvements biologiques et périodicité du suivi

Trois missions sont menées annuellement : deux en saison chaude (février et novembre) et une en saison froide (juin à août). Lors de chacune de ces missions d'une journée et sur l'ensemble des deux zones, les populations de dinoflagellés et de cyanobactéries sont identifiées d'un point de vue taxonomique, quantifiées et caractérisées au niveau de leur potentiel毒ique.

Une fois par an, en février, la ciguatoxicité au sein de la chaîne alimentaire est évaluée grâce à des collectes de bénitiers et de poissons effectuées dans la ZT et la ZNT.

Tableau 9 : Caractéristiques des 18 points de prélèvements.

	Nom	Profondeur moyenne	Latitude	Longitude
Zone dite non toxique ZNT	1A	1 m	-20.764910	167.099106
	1B	3 m	-20.765079	167.099106
	1C	4 m	-20.765350	167.099075
	2A	1 m	-20.765079	167.097275
	2B	3 m	-20.765249	167.097321
	2C	4 m	-20.765560	167.097427
	3A	1 m	-20.765825	167.096016
	3B	3 m	-20.766016	167.096064
	3C	4 m	-20.766129	167.096100
Zone dite toxique ZT	4A	1 m	-20.766201	167.093655
	4B	3 m	-20.766380	167.093781
	4C	4 m	-20.766688	167.093956
	5A	1 m	-20.767310	167.093006
	5B	3 m	-20.766803	167.092529
	5C	4 m	-20.767059	167.092760
	6A	1 m	-20.767771	167.091408
	6B	3 m	-20.768112	167.091579
	6C	4 m	-20.768338	167.091794

II.2.b.1 Dinoflagellés

Les dinoflagellés ciguatérigènes sont des microalgues épiphytes de macroalgues hôtes ou de débris coralliens ; leur prélèvement s'effectue selon la méthode décrite par Chinain *et al.* (1999a).

Récolte des macro-algues supports

A chaque point de récolte, les macroalgues-support identifiées (ex. *Halimeda*, *Turbinaria*, *Dictyota*, *Lobophora* ; photos 13 à 16) ou les débris coralliens sont récoltés en plongée libre et conservés dans des poches plastiques maintenues fermées avec l'eau de récolte.



Photos 13, 14, 15, 16 : Exemples de macroalgues-supports des dinoflagellés rencontrées sur le site d'étude de Hunêtë (13 : *Halimeda*, 14 : *Turbinaria*, 15 : *Dictyota* et 16 : *Lobophora*).

Le choix du support des microorganismes (débris coralliens ou macroalgues) dépend de la disponibilité de ce substrat au niveau du point de prélèvement. Chaque fois que cela est possible, la récolte d'environ 200 à 500 g de macroalgues est privilégiée afin de pouvoir dénombrer les cellules de dinoflagellés et rapporter ce nombre à la masse macroalgale, permettant ainsi une étude comparative plus aisée d'une saison à l'autre. En revanche, les débris coralliens pouvant représenter des masses très variables, le dénombrement des microorganismes épiphytiques rapportée à la masse de corail n'a pas été retenu.

Il est intéressant de noter que les dinoflagellés ont des préférences quant à leurs hôtes, en fonction des avantages compétitifs qu'ils leur confèrent (e.g. disponibilité de substrat, paramètres favorisant leur croissance, protection vis-à-vis des prédateurs, ...) (Nakahara *et al.*, 1996 ; Cruz-Rivera and Villareal, 2006).

De manière générale, nos prélèvements sont surtout constitués de débris coralliens supports, étant donné que dans la plupart des points de prélèvements, peu de macroalgues sont présentes.

Extraction des cellules par agitation

Les poches sont agitées vigoureusement pendant 1 mn afin de décrocher les dinoflagellés de leur support macroalgal. L'eau de mer est filtrée sur 3 tamis de porosité 500, 250 et 45 µm. La fraction comprise entre 45 et 250 µm est récupérée à l'aide d'une pissette d'eau de mer. Elle est conservée au formol à 5% d'eau de mer filtrée à 0,45 µm et tamponnée à pH 7,0 au borate de potassium ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$).

Comptage des cellules au microscope

L'observation, l'identification et le dénombrement des microorganismes sont réalisés en microscopie optique. Le protocole de prélèvement des microorganismes est synthétisé en figure 23.



Figure 23: Protocole de prélèvement des microorganismes : prélèvement manuel en plongée libre, extraction des cellules épiphytes par agitation, filtration et récupération des microorganismes, observation des échantillons au microscope optique.

En situation d'efflorescence de microalgues (i.e. densités cellulaires > 1 000 cellules par g d'algue), le prélèvement de biomasse plus conséquente est effectué en vue des analyses toxicologiques ultérieures.

II.2.b.2 Cyanobactéries

Les cyanobactéries présentent l'avantage d'être visibles à l'œil nu. Ainsi, leur présence et leur zonation peuvent être appréciées relativement facilement en plongée libre.

Quatre types de prélèvements sont effectués en vue de (i) leur identification morphotaxonomique, et/ou (ii) l'évaluation de leur potentiel toxique en cas d'efflorescences, iii) leur mise en culture et iv) leur caractérisation moléculaire.

II.2.b.2.a Prélèvement destiné à l'identification morphotaxonomique

Les filaments sont délicatement prélevés manuellement ou à l'aide de pince afin de ne pas lyser les cellules et aussitôt préservés dans du formol à 5% en eau de mer filtrée (pH 7,0). A chaque prélèvement, sont associées des photographies prises *in situ*; les caractéristiques biologiques et le point d'échantillonnage sont relevés.

Nous nous sommes appuyés sur l'expertise scientifique du Professeur Stjepko Golubic, spécialiste des cyanobactéries de l'Université de Boston.

II.2.b.2.b Prélèvement pour caractérisation moléculaire

Chaque échantillon est stabilisé dans de l'éthanol absolu à 50% en eau de mer filtrée à 0,45 µm, en vue d'analyses moléculaires (identification de la diversité génétique, analyse de la toxicité) réalisées à l'Institut Pasteur de Paris dans le cadre du projet Aristocya financé par l'ANR CES (Contaminants Environnement Santé). Ce travail ne rentre pas directement dans les objectifs de thèse, toutefois certains résultats préliminaires seront abordés dans la partie « Discussion ».

II.2.b.2.c Essai de mise en culture

Des prélèvements de cyanobactéries sont effectués afin de les mettre en culture au laboratoire de Nouméa. Ces échantillons sont prélevés délicatement et conservés dans des flacons avec de l'eau de mer dont les proportions sont au minimum de 1 volume pour 10. Les cyanobactéries sont mises en milieu de culture liquide ou solide au plus tard 24 h après le prélèvement.

II.2.b.2.d Prélèvement pour analyses toxicologiques

Les grandes couvertures de cyanobactéries sont prélevées selon des techniques différentes dépendant des conditions de collecte (profondeur, houle...), de la morphologie des cyanobactéries (type « biofilm » ou longs filaments...) ou de leur substrat (débris coralliens, sables ou colonne d'eau dans le cas des formes pélagiques). L'objectif est de recueillir suffisamment de biomasse en vue des analyses toxicologiques tout en mettant l'accent sur la qualité de l'échantillon (éviter les débris et l'association avec d'autres espèces...). De manière générale, les cyanobactéries benthiques et pélagiques récoltées sont constituées de filaments de plusieurs mm à quelques cm de long qui s'agglutinent pour former des colonies d'aspects morphologiquement variables (photos 17, 18 et 19).



Photos 17, 18, 19 : Vues macroscopiques de diverses colonies de cyanobactéries filamentueuses benthiques et pélagiques.

Les mattes de cyanobactéries sont récoltées manuellement, à l'aide d'un tamis ou d'un aspirateur sous marin (photo 20). Les échantillons sont rapidement conditionnés en flacon, maintenus à l'abri de la lumière et conservés à +4°C jusqu'à leur traitement, au plus tard 24 h après la récolte.



Photo 20 : Récolte en plongée bouteille de cyanobactéries à l'aide d'un aspirateur sous-marin.

II.2.b.3 Bénitiers

Des bénitiers (espèces non définies) récoltés dans la ZT ont provoqué deux sévères intoxications. Les bénitiers sont un élément important de la nourriture traditionnelle des insulaires dans l'ensemble de la région indo-pacifique. Parmi les sept espèces de bénitiers réparties à travers les régions tropicales, six sont présentes en Nouvelle-Calédonie, l'espèce *Tridacna maxima* présentant la plus grande répartition géographique. Elles sont inscrites sur l'Annexe II de la liste rouge des espèces menacées afin de contrôler leur commerce et leur exportation (CITES : « Convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvages menacées d'extinction »).

Le bénitier (ou tridacne) est un mollusque bivalve des fonds récifaux coralliens peu profonds (50 cm à 15 m). Des individus de plusieurs centaines d'années ont été observés et la taille adulte varie de 15 cm jusqu'à 1 m pour les spécimens les plus gros (*Tridacna gigas*). Organisme micro-filtreur et sessile, il se nourrit et s'oxygène grâce à l'aspiration créée par son manteau. Le siphon inhalant conduit l'oxygène et la matière organique planctonique environnante vers les branchies puis la bouche et le système digestif. Ses excréptions sont rejetées par le siphon exhalant situé à l'arrière de l'animal. Le manteau présente de vives

couleurs dues aux zooxanthelles qu'il renferme. Ces algues unicellulaires du genre *Symbiodinium* vivent en symbiose mutualiste avec le bénitier en consommant son CO₂ et en procurant en retour divers nutriments à son hôte défini comme du phototropisme positif (Rosewater, 1965 ; Braley, 1989 ;).

Dans le cas de notre étude, nous rencontrerons les espèces *Tridacna squamosa* (Lamarck, 1819), *T. maxima* (Röding, 1798) et *Hippopus hippopus* (Linné, 1758) appelé localement le bénitier rouleur en raison de l'absence de byssus, organe qui permet à l'animal de se fixer au substrat (figure 24). Dans la mesure du possible, la même espèce est collectée afin de minimiser les variabilités inhérentes à la physiologie propre à chaque espèce.

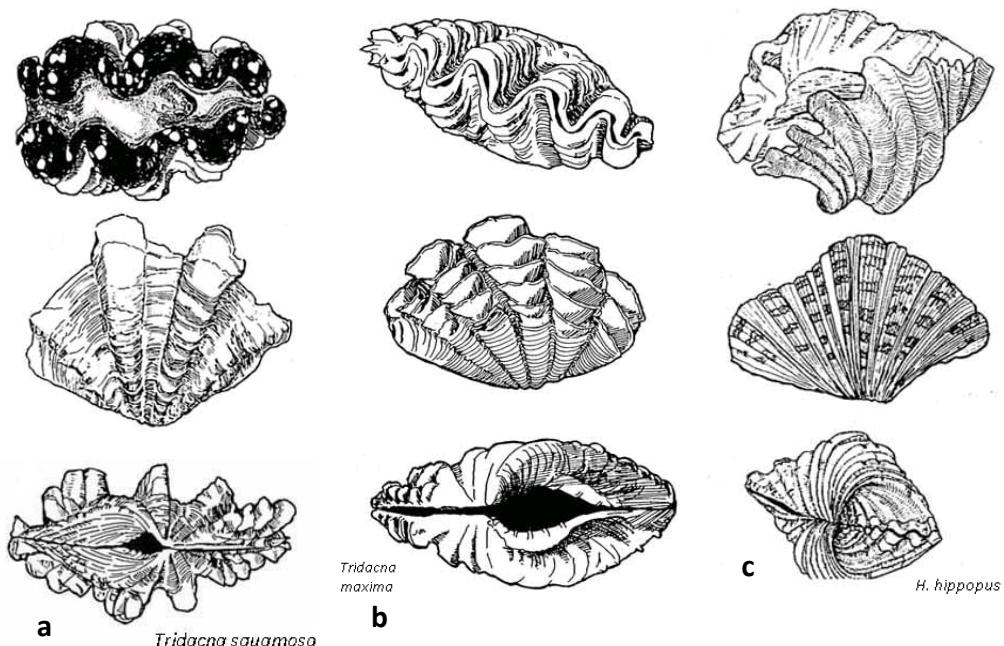


Figure 24 : Espèces de bénitiers rencontrées sur le site d'étude : a) *Tridacna squamosa*, b) *Tridacna maxima* et c) *Hippopus hippopus*.

Une fois par an (en février), les bénitiers sont prélevés manuellement à l'aide de couteau afin de les détacher de leur support (méthode de pêche traditionnelle). Six individus sont collectés dans la ZT et aux moins trois autres dans la ZNT de manière à minimiser l'impact de l'étude sur la ressource alimentaire de la tribu.

Chaque individu est identifié, photographié et mesuré (longueur maximale). La chair est prélevée entièrement sans séparation des différents organes. La masse totale du corps est pesée et conservée à -20°C jusqu'à leur traitement au laboratoire.

Afin d'avoir une toxicité globale de l'individu, l'analyse de la toxicité est réalisée sur l'intégralité du corps (chair et hépatopancréas). Lors de la préparation du repas, l'hépatopancréas, organe concentrateur noir, est enlevé ; il est donc probable que la toxicité potentielle dosée soit supérieure à celle à laquelle le consommateur est exposé.

II.2.b.4 Poissons

L'étude épidémiologique a révélé que les perroquets (espèces non identifiées) ont causé des intoxications chez 15 personnes (11 avec des spécimens récoltés en ZT et 4 en ZNT). Les intoxications liées à la consommation de poissons herbivores de début de chaîne alimentaire ne sont pas fréquentes en Nouvelle-Calédonie. Elles seraient plutôt caractéristiques de zones ciguatériques en émergence, les herbivores constituant l'un des premiers maillons contaminés.

Afin d'évaluer l'évolution spatiale et temporelle de la toxicité de la zone incriminée, nous avons choisi comme « **poissons-sentinelles** » les perroquets.

Ainsi, 5 individus au minimum ont été chassés annuellement au fusil sous-marin avec un suivi sur 3 ans. Chaque spécimen collecté est photographié, identifié, pesé et mesuré. L'évaluation de la ciguatoxicité des poissons est basée sur le dosage des toxines dans les chairs. Dans la mesure où les toxines sont différemment réparties en fonction des organes (teneurs en toxines variables de la tête à la queue), pour chaque individu le dosage de la toxicité est effectué sur un broyat préparé à partir de la totalité des filets qui sont conservés à -20°C jusqu'à leur traitement au laboratoire.

II.2.c Extraction et purification

Différents types d'extraction et de purification sont utilisés en fonction (i) des toxines recherchées, (ii) de la matrice et (iii) des tests de dosage utilisés :

- Une extraction par partage liquide-liquide (dite **extraction de masse**) pour extraire et séparer de manière large toutes les familles toxiniques présentes dans des matrices complexes (bénitier et cyanobactérie),

- Une extraction en phase solide (SPE) (dite **extraction rapide**) appliquée directement sur la chair de poissons et sur les extraits liposolubles de cyanobactéries pour extraire préférentiellement les toxines de type CTX,

- Une étape de purification complémentaire par chromatographie liquide basse pression appliquée aux extraits liposolubles délipidés de bénitiers.

II.2.c.1 Extraction de masse (matrices brutes de cyanobactéries et bénitiers)

II.2.c.1.a Principe

« L'extraction de masse » (extraction et séparation liquide-liquide) permet de séparer les toxines liposolubles (ex. CTXs) des toxines hydrosolubles (ex. MTXs, STXs). L'objectif est d'identifier la nature des toxines potentiellement présentes dans ces deux organismes. Aussi, il est primordial d'utiliser une technique d'extraction permettant d'extraire la majorité des toxines à l'aide d'un solvant à large pouvoir d'extraction, le méthanol (MeOH) associée à une extraction complémentaire au (MeOH) acide pour isoler d'éventuelles autres toxines hydrosolubles (Mc Elhiney *et al.*, 1998 ; Nicholson and Bruch, 2001 ; Laurent *et al.*, 2008) (figure 25).

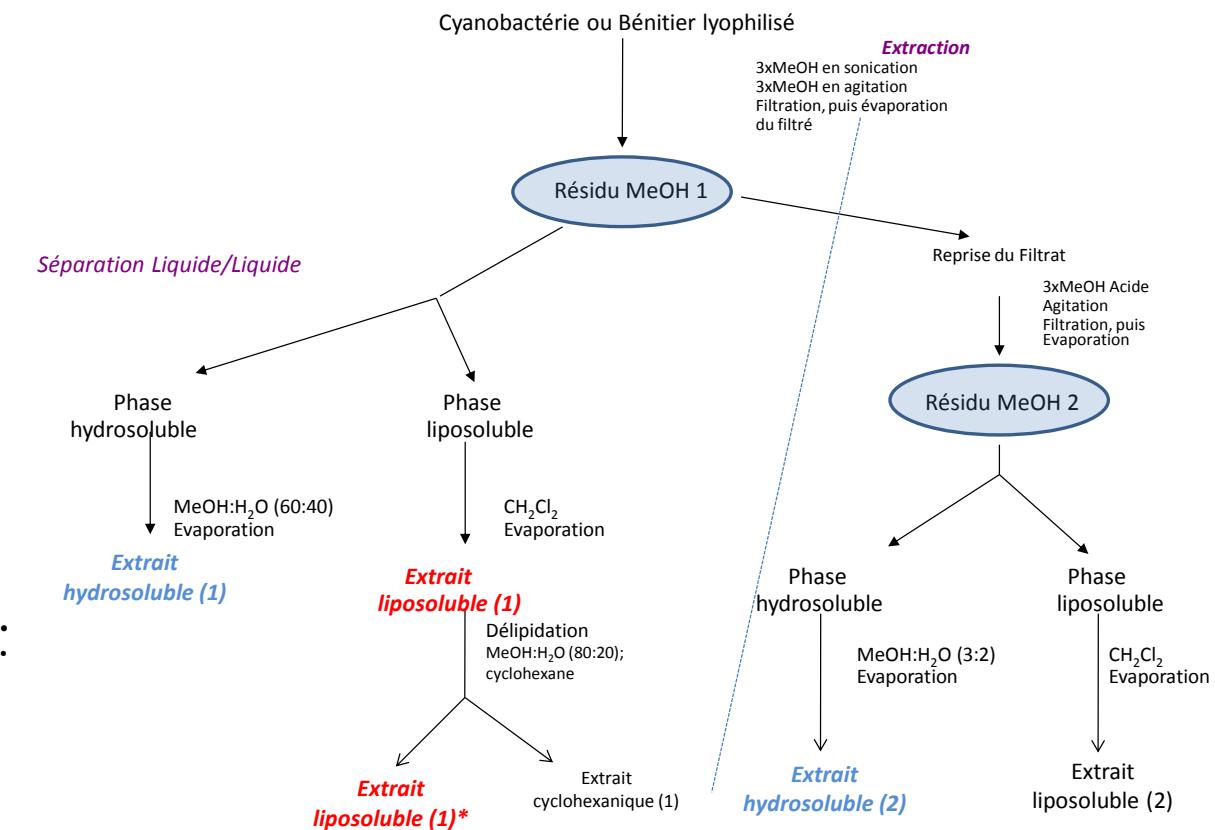


Figure 25: Protocole d'extraction des bénitiers et des cyanobactéries (d'après Mc Elhiney *et al.*, 1998 ; Nicholson and Bruch, 2001 ; Laurent *et al.*, 2008) ; Extrait liposoluble (1) des cyanobactéries et extrait liposoluble (1)* délipidé des bénitiers.

II.2.c.1.b Préparation des échantillons

Cyanobactéries.

Les cyanobactéries ont la caractéristique de relarguer très rapidement leur contenu cellulaire. Cette propriété est visible à la vive coloration rose violacée de l'xsudat (pigments de type phycoérythrine et phycocyanine) (photo 21). C'est pourquoi les mattes de cyanobactéries, conservées au maximum 24 h dans les flacons à +4°C, sont traitées avec leur xsudat afin de prendre en compte à la fois les endotoxines et les exotoxines.

L'échantillon est congelé et lyophilisé et la matière sèche pesée. Environ 10 g de matière lyophilisée sont conservés pour être traités au laboratoire de l'IFREMER de Nantes pour la détection de cyanotoxines connues (comme les familles des AnTX-a, PTXs, STXs, microcystines, DSTs et AO). Le reste du matériel est traité en extraction liquide-liquide au laboratoire à Nouméa.

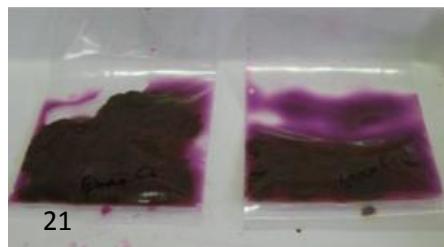


Photo 21 : Conditionnement des cyanobactéries avant la lyophilisation, le relargage des pigments est visible à la vive coloration indigo.

Bénitier.

L'intégralité du corps du bénitier (manteau, hépatopancréas, viscères, muscles...) est pesée et finement broyée, homogénéisée puis congelée avant lyophilisation.

II.2.c.1.c Extraction

Les échantillons lyophilisés de cyanobactérie ou de bénitier sont extraits par agitation mécanique 3 à 6 h au MeOH à 100% avec ultrasonication durant 30 mn à 1 h. Après filtration sur Büchner®, l'extrait méthanolique est séché à l'évaporateur rotatif à 40°C. L'opération est répétée trois fois et les extraits séchés sont rassemblés puis pesés.

II.2.c.1.d Séparation

Cet extrait méthanolique séché est dissous dans un mélange composé de dichlorométhane (CH_2Cl_2) à 100% et d'une solution de MeOH : H_2O dans les proportions 60 : 40. L'intégralité du l'extrait MeOH (1) est agitée dans une ampoule à décanter puis laissée au repos jusqu'à la séparation des phases. La phase apolaire (CH_2Cl_2) ou phase liposoluble est susceptible de contenir des CTXs. La phase polaire ou phase hydrosoluble (MeOH : H_2O) est susceptible de contenir des toxines de types STXs ou MTXs de plus forte polarité. Ces phases sont séchées et constituent l'**extrait hydrosoluble (1)** et l'**extrait liposoluble (1)**. Dans la suite du mémoire, ils seront désignés respectivement par « extrait hydrosoluble » et « extrait liposoluble ».

En parallèle, le matériel biologique extrait au MeOH est de nouveau extrait au MeOH acidifié (acide acétique, 0,05% ; V : V) afin de compléter l'extraction de l'ensemble des toxines potentiellement présentes (étape de « reprise du filtrat », figure 25). Le même protocole de séparation est ensuite appliqué. Les phases séchées constituent l'**extrait hydrosoluble (2)** susceptible de contenir des toxines de type AnTxs-a ou STXs, et l'**extrait liposoluble (2)**.

Les extraits de bénitier subissent une étape supplémentaire de purification par délipidation.

II.2.c.1.e Délipidation de l'extrait liposoluble de bénitier

Le bénitier constitue une matrice complexe riche en acide gras. Il est donc nécessaire d'effectuer une délipidation de la phase liposoluble afin d'éviter d'éventuels effets matrices lors des tests de dosages.

L'extrait liposoluble est repris dans du cyclohexane (C_6H_{12}) et un mélange MeOH : H₂O 80 : 20). Après agitation et décantation, deux phases séparent les composés lipidiques des composés d'intérêt. Les fractions sont évaporées et conservées sèches à -20°C. Seule la phase polaire au méthanol aqueux qui constitue l'extrait liposoluble (1)* contenant potentiellement les toxines de type CTXs, sera testée sur test N2A.

II.2.c.2 Extraction rapide (matrice brute de poisson)

II.2.c.2.a Principe

Cette méthode chromatographique d'extraction en phase solide (SPE) a été mise au point à l'ILM en 2000 et validée par le test souris et le test RBA (Darius *et al.*, 2007). Cette méthode d'extraction (figure 26) permet d'isoler de la chair de poissons une fraction susceptible de contenir les MTXs (F1) et une autre susceptible de contenir des CTXs par polarités différentes (F2). La phase mobile est constituée de solvants de polarité décroissante et la phase stationnaire d'une colonne de silice en phase inverse C18.

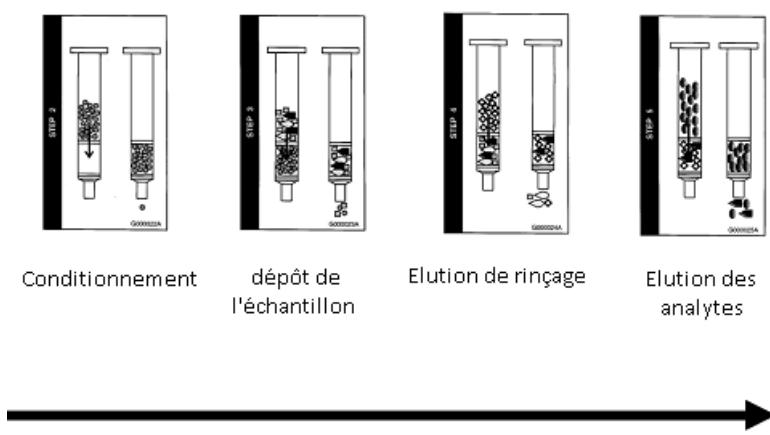


Figure 26: Étapes de l'extraction rapide en phase solide.

II.2.c.2.b Méthode

Préparation des échantillons

L'évaluation de la toxicité d'un poisson est basée sur celle des tissus de chair. L'intégralité de la chair de poisson (filets) prélevée est broyée et homogénéisée à l'aide d'un mixeur (type alimentaire). Trois aliquots de 5 g de chair broyée sont prélevés et conservés à -20°C jusqu'à l'étape d'extraction.

Extraction

Un volume de 7 mL de MeOH à 100% est ajouté à chacun des aliquots. Les échantillons sont agités mécaniquement, incubés dans un bain à ultrason pendant 2 h, puis maintenus à -20°C pendant 12 h. Les échantillons sont ensuite centrifugés 2 fois 5 mn à 3 000 rpm (rotations

par minute) afin de récupérer le surnageant. Cette manipulation est effectuée 2 fois afin de s'assurer de récupérer un maximum de solvants d'extraction.

Purification

L'extrait méthanolique est ensuite purifié sur cartouches de silice en phase inverse (Sep-Pak® Plus C18, Waters), fixées sur un système de cuve à vide permettant une extraction rapide et homogène des répliquats. Les cartouches sont conditionnées par 7 mL de mélange MeOH : H₂O (70 : 30). Le surnageant issu de la seconde centrifugation (extrait) est prélevé et dilué dans un volume d'eau défini afin de respecter les conditions d'élution MeOH : H₂O (70 : 30). L'échantillon homogénéisé à l'aide d'une pipette par flux-reflux est filtré avant passage sur la cartouche à l'aide d'un filtre Millex® à 0,45 µm. Le système filtre-cartouche est fixé sur la cuve à vide (photo 22). Lors du passage du mélange dans la cartouche, les CTXs sont adsorbées sur la phase stationnaire, tandis que les composés plus polaires comme les MTXs sont élués et récupérés dans la première fraction. Les CTXs sont ensuite éluées par passage de 7 mL de MeOH : H₂O (90 : 10).

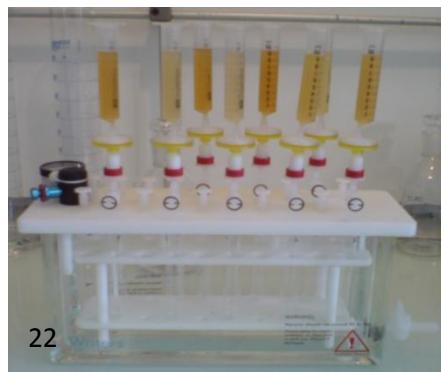


Photo 22 : Système de cuve à vide sur lequel sont fixés les filtres et les cartouches utilisés pour l'extraction rapide.

Les fractions sont récupérées et séchées à l'évaporateur à flux d'air (température de 45°C), ces extraits sont pesés et conservés à 4°C. La dernière fraction d'élution 90 : 10 susceptible de contenir les CTXs est analysée *in vitro* par test de N2A.

II.2.c.3 Purification sur Sep-pak® (extraits liposolubles de cyanobactéries)

II.2.c.3.a Principe

Cette étape de purification complémentaire sur extraits liposolubles de cyanobactéries s'avère indispensable afin d'éviter d'éventuels effets liés à la matrice au niveau des tests N2A et RBA. Le protocole utilisé est très similaire à celui utilisé pour l'extraction rapide des chairs de poissons (voir ci-dessus).

II.2.c.3.b Méthode

Cinq (5) mg de l'extrait liposoluble de cyanobactéries sont purifiés sur cartouche de silice en phase inverse Sep-pak®. L'extrait est dilué dans 10 mL de MeOH : H₂O (70 : 30) et déposé sur la cartouche activée. La première fraction est récupérée puis 10 mL du même solvant sont déposés : ces 20 mL rassemblés constituent la première fraction **F1** susceptible de contenir les composés de plus forte polarité. Ensuite, les composés sont éluées par 20 mL de MeOH : H₂O (90 : 10), cette fraction constituant la fraction **F2** susceptible de contenir des composés de polarité proche des CTXs. Enfin, la cartouche est éluée par 20 mL de MeOH (100%). Cette fraction **F3** contient les composés les moins polaires. Ces trois fractions F1, F2 et F3 sont séchées sous flux d'air à 45°C et conservées à -20°C jusqu'au moment des analyses toxicologiques par tests *in vitro*, N2A et/ou RBA.

II.2.c.4 Purification par chromatographie liquide basse pression (extraits liposolubles de bénitiers)

Les extraits liposolubles des bénitiers sont purifiés successivement sur deux colonnes de chromatographie (Florisil® et Sephadex LH20) selon la méthodologie décrite par Hamilton *et al.*, (2002).

L'extrait liposoluble (1) (E1 pour étape 1) est fractionné sur colonne de chromatographie préparée manuellement avec du Florisil® en utilisant le gradient d'élution suivant : hexane : acétone : méthanol (3:0:0 → 3:1:0 → 3:1:0 → 3:1:0 → 3:1:0 → 3:1:0 → 0:9:1 → 0:9:1 → 0:0:1). Les 9 fractions (E1F1 à E1F9) sont éluées dans un volume de phase mobile défini en fonction des caractéristiques de la colonne. Ensuite, les 2 fractions susceptibles de contenir les CTXs (hexane : acétone : méthanol ; 0:9:1, soit E1F5 et E1F6) sont rassemblées puis purifiées sur une colonne de chromatographie préparée manuellement avec du Sephadex LH20 en utilisant le système de solvants suivant: CH₂Cl₂ : MeOH (1 : 1). Les 5 fractions issues de cette seconde étape de purification (E2F1 à E2F5) sont éluées successivement par un volume de phase mobile défini en fonction des caractéristiques de la colonne.

Les fractions séchées sont conservées à +4°C jusqu'au moment des analyses toxicologiques par les tests N2A et RBA.

II.2.d Dosage de la toxicité

II.2.d.1 Choix des tests de détection

La difficulté dans la détection des cyanotoxines et des phycotoxines est leur grande diversité tant en termes structurels, qu'en mode d'action (notion de spécificité du test) et pour une même famille, les congénères ont des degrés de toxicité très variables (notion de sensibilité du test). Dans le cadre de notre étude, deux objectifs sont poursuivis : (i) détecter et doser spécifiquement les CTXs présentes dans les matrices analysées et (ii) identifier et doser d'autres familles toxiniques coexistant éventuellement avec les CTXs.

Pour la première approche, nous avons donc privilégié l'utilisation du test N2A, en association avec le procédé d'extraction rapide spécifique des CTXs (***dosage de la toxicité des poissons***).

Pour la seconde approche, nous nous sommes orientés en priorité vers le test souris et le test N2A qui permettent d'évaluer la toxicité globale d'un échantillon obtenu par le procédé d'extraction de masse (***dosage de la toxicité des cyanobactéries et bénitiers***). Le test RBA est utilisé en complément pour tenter de préciser les modes d'action des composés toxiques mis en évidence.

Le tableau 10 synthétise les tests toxicologiques utilisés (test souris, N2A ou RBA) en fonction des différents modes d'extraction appliqués et des matrices biologiques analysées. Ces différents tests biologiques sont présentés dans la partie suivante.

Tableau 10 : Synthèse des tests utilisés pour évaluer le potentiel toxinique des différentes matrices biologiques selon les modes d'extraction et de purification utilisés.

Matrice	Extraction de masse	Extraction rapide	Purification sur colonnes
Cyanobactérie	Test souris Test N2A	-	Test N2A Test RBA
Bénitier	Test souris Test N2A Test RBA	-	Test N2A Test RBA
Poisson	-	Test N2A	-

II.2.d.2 Test de toxicité aiguë sur souris : Test souris

II.2.d.2.a Principe

La souris, modèle mammifère sensible, a été utilisée pendant longtemps dans le domaine de la recherche de la ciguatéra mais également pour la détection de nombreuses

autres toxines. Le bio-essai sur souris présente un double intérêt : i) il donne des indications sur la **toxicité globale** d'un extrait (résultante des effets toxiques cumulés de l'ensemble des composés présents) et ii) certains des symptômes observés chez la souris peuvent utilement renseigner sur la **nature des toxines** présentes dans les extraits. En revanche, il ne constituera qu'une étape préliminaire du criblage de toxicité des organismes marins.

Le test souris est basé sur l'observation des symptômes de l'animal et la durée de leurs effets à la suite de l'injection i.p. d'extraits potentiellement toxiques. L'ensemble des expérimentations est réalisé selon les conditions de pratiques et d'éthiques définies par la directive du conseil de la communauté européenne du 24 novembre 1986 (86/609/EEC). Grâce au soutien de l'IPNC, ces manipulations sur animaux qui requièrent un certain nombre de conditions et de pratiques particulières (animalerie, environnement adapté) ont pu avoir lieu.

II.2.d.2.b Matériels et méthodes

Des souris OF1 (Iffa-Credo, L'Arbresle, France) de $20\text{ g} \pm 2\text{ g}$ sans distinction de sexe sont utilisées comme modèle pour le « Test souris » (Dechraoui *et al.*, 1999). Les animaux sont maintenus dans des conditions de nourriture et d'eau *ad libitum*.

L'extrait sec, dissous dans $300\text{ }\mu\text{L}$ de solution saline ($\text{NaCl à } 0,9\%$) contenant 0,1% de Tween 60, est administré en i.p.. Les doses testées en dupliquat varient de 0,5 à 5,0 mg d'extrait sec par g de souris selon l'extrait considéré (bénitier ou cyanobactérie) : trois concentrations sont testées. Au total, six individus sont injectés par extrait. Le témoin reçoit $300\text{ }\mu\text{L}$ de la solution saline à 0,1% de Tween 60 ($n = 2$). Les symptômes et le comportement de l'animal sont observés pendant 24 h. Les souris sont sacrifiées au-delà de 48 h après l'injection.

La toxicité des extraits secs est exprimée en DL_{50} (mg d'extrait sec / g de souris), elle est définie comme la dose capable de tuer 50% du lot de souris sur 24 h. Pour des raisons d'éthiques et de techniques liées aux faibles quantités d'extrait disponibles, nous avons choisi de minimiser le nombre de souris utilisé par analyse. Ainsi, en testant 3 concentrations en duplicit par extrait ($N = 2 * 3$), les informations disponibles permettent uniquement d'estimer les DL_{50} . Dans notre cas d'étude, cette information reste amplement suffisante.

La DL_{50} estimée et les symptômes (caractère aigu et durée) nous permettent de définir trois degrés de toxicité : atoxique (ATox), toxique (Tox +) et fortement toxique (Tox++) définis au tableau 11.

Ainsi, la toxicité d'un extrait est caractérisée par son degré de toxicité (**potentiel toxique**) et les symptômes caractéristiques (ex. : paralysie, agitations, cris...) observés chez la souris (**type toxinique**). Les symptômes caractéristiques observés chez la souris après injection en i.p. de diverses toxines pures sont présentés dans le tableau 12.

Tableau 11 : Critères utilisés pour classer les extraits testés en test souris par niveaux de toxicité (effet de l'injection i.p. de 1 mg d'extrait de cyanobactérie ou 5 mg d'extrait de bénitier par g de souris).

Classe de toxicité	Temps de survie	Temps de récupération	Phase de coma
Atoxique (ATox)	> 48 h	-	-
Toxique (Tox+)	> 48 h	< 2 h	-
Fortement Toxique (Tox++)	< 10'	> 24 h	présente

Tableau 12 : Symptômes caractéristiques chez la souris après injection en i.p. des différentes cyanotoxines et phycotoxines (d'après Frémy et Lassus, 2001 ; Cronberg and Annadotter, 2006 ; Riobó *et al.*, 2008 ; Aráoz *et al.*, 2009).

	Symptômes observables	DL ₅₀ µg / kg
Anatoxine-a	Titube, suffocation, agitation, convulsions, mort par détresse respiratoire	250
Homoanatoxine-a	Paralysie du corps, convulsions, mort par détresse respiratoire	250
Anatoxine-a(s)	Semblables aux symptômes pour l'anatoxine-a, ataxie, incontinence urinaire, hypersalivation, tremblements	20
Saxitoxine	Respiration irrégulière, perte de coordination, mouvements saccadés, ophtalmie, mort par détresse respiratoire	10 - 30
Microcystines nodularines	Diarrhée, pâleur des muqueuses, vomissement, faiblesse, anorexie, mort (nécrose du foie)	36 - 122
Lyngbyatoxine	Prostration, paralysie progressive, convulsions	
Acide domoïque	Spasmes, se gratte derrière les oreilles avec les pattes arrières	-
Acide okadaïque	Prostration, faiblesse des membres, convulsions, temps de survie: plusieurs heures	190
Brévétoxines	Paralysie progressive, cyanose, diarrhée	170 -200
CTXs	Diarrhée, dyspnée, paralysie, convulsions	0,25 - 3,6
MTXs	Hypothermie, piloérection, dyspnée, paralysie progressive du train-arrière aux membres supérieurs, halètement, convulsions post-mortem	0,05 - 0,1
Palytoxine	Paralysie progressive, tremblement du train-arrière et des membres, ataxie, cyanose, dyspnée, diarrhée, mort par détresse respiratoire	0,01 - 0,1

II.2.d.3 Tests de cytotoxicité sur neuroblastomes, Test N2A

II.2.d.3.a Principe

Le principe du test est basé sur la capacité des CTXs à se fixer spécifiquement sur le site 5 des CSSP (Manger *et al.*, 1995). Ce test de cytotoxicité utilise comme modèle des neuroblastomes de souris (Neuro-2A) (ATCC -CCL-131™). Il permet donc une détection de l'**ordre du pg** des toxines agissant spécifiquement sur les CSSP grâce à l'utilisation de potentialisateurs, mais également un **dosage global de la toxicité** d'extraits divers (chairs ou foies de poissons, cyanobactérie, bénitier).

Les cellules mises en culture sont prétraitées par l'action combinée de deux potentialisateurs : la vératridine (V) et l'ouabaïne (O). En présence de toxines activant les CSSP (CTXs ou PbTxs), la concentration intracellulaire en Na⁺ augmente ce qui a pour conséquence une augmentation de la mortalité cellulaire. Le dosage des cellules vivantes est effectué par un test au MTT. Ce test permet donc dans un premier temps, de discriminer les toxines agissant sur les CSSP puis dans certaines conditions réactionnelles spécifiques celles qui sont activatrices (CTXs et PbTxs) vs inhibitrices (STXs et TTX) des CSSP.

Les avantages et inconvénients du test sont présentés dans le chapitre 1 (cf. ch1.II.6.b.1.b). L'aspect technique et les adaptations faites dans le cadre de notre étude sont développés dans cette partie.

II.2.d.3.b Matériels et méthodes

II.2.d.3.b.(i) Conditions expérimentales

(a) Matériel cellulaire

Les cellules utilisées, les Neuro-2A, sont issues d'une lignée cellulaires de neuroblastomes de souris (*Mus musculus*), de souche « A albinos » (photo 23). Cette tumeur, volontairement développée, est appelée neuroblastome (ou sympathoblastome). Elle dérive de la crête neuronale de l'embryon qui constitue le système nerveux autonome sympathique responsable de la sécrétion des catécholamines.

(b) Mise en culture

Tous les produits utilisés sont, sauf indication contraire, fournis par Sigma-Aldrich.

Afin d'éviter toutes contaminations, l'ensemble des manipulations s'effectue en conditions stériles sous hotte à flux laminaire et les différentes solutions et milieux de culture sont achetés stériles ou stérilisés par autoclavage ou filtration à 0,2 µm avant utilisation.

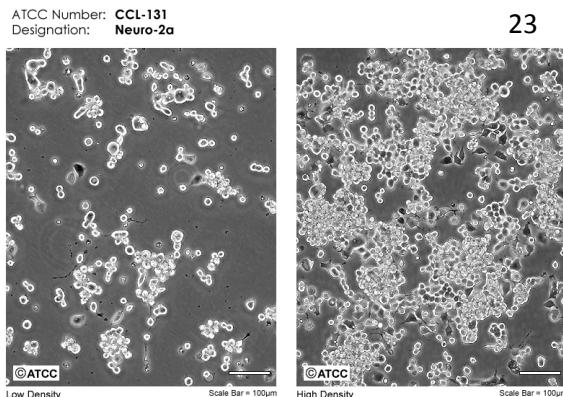


Photo 23 : Vues au microscope des neuroblastomes de souris, Neuro-2A (source ATCC).

Milieu de culture et mise en culture

Le milieu de culture utilisé est le milieu complet RPMI-1640 contenant 25 mM d'HEPES enrichi à 5% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté (ou inactivé à 56°C pendant 30 mn), 1mM de pyruvate de sodium, 2 mM de L-glutamine, du bicarbonate de sodium et 50 µg / mL de streptomycine, 50 U / mL de pénicilline et 50 µg / mL d'amphotéricine B.

Dans des flacons de culture (75 cm², Corning), les cellules sont mises à incuber à 37°C dans une étuve en atmosphère humide à 5% en CO₂. Dans ces conditions, les Neuro-2A qui sont des cellules adhérant naturellement aux surfaces, ont un temps de génération compris entre 16 et 24 h. Le milieu est changé toutes les 24 h. Elles tendent naturellement vers la formation d'un tapis cellulaire. L'aboutissement d'un tapis cellulaire est appelé confluence.

Trypsinisation

Lorsque les cellules sont à confluence ou si l'on souhaite favoriser la multiplication cellulaire, il est nécessaire de les individualiser par une étape de trypsinisation. La trypsine est une enzyme protéolytique dont l'action se concentre sur les ponts arginyl et lysyl des chaînes polypeptidiques. Pour une action optimale, il est important que le milieu soit à pH 6-9 et à 37°C. L'action de la trypsine est combinée à celle de l'acide éthylène tétra-acétique (EDTA), chélateur d'ions divalents nécessaires au maintien des jonctions cellulaires.

Le milieu de culture est éliminé et remplacé par 2 mL de solution saline tamponnée au phosphate, le PBS (Phosphate Buffer Saline) sans Ca²⁺ ni Mg²⁺. Le PBS est aspiré puis remplacé par 3 mL de solution de trypsine-EDTA. Afin d'optimiser la réaction enzymatique, la solution est incubée 10 à 15 mn à 37°C. Enfin, l'ajout de 10 mL de milieu permet d'arrêter l'action de la trypsine, l'agitation par flux-reflux à l'aide d'une pipette finalisant l'étape de séparation des cellules les unes des autres. Les cellules mises en suspension sont alors bien rondes et individualisées. La concentration cellulaire de la suspension est déterminée grâce à la numération au bleu de Trypan.

Numération cellulaire au bleu de Trypan

La numération permet de vérifier la densité et la viabilité cellulaires pour ainsi calculer le facteur de dilution en fonction des étapes suivantes (repiquage, congélation ou test de cytotoxicité). Une fois les cellules individualisées et la solution cellulaire homogénéisée par trypsination, la numération se fait sur un aliquot de 10 µL de suspension cellulaire. Puis, 10µL de Bleu de Trypan à 0,4 % en PBS sont ajoutés à cet aliquot, agités et laissés agir 5 mn. Ce colorant d'exclusion permet la numération des cellules viables, il n'est internalisé que par les cellules mortes qui apparaissent alors bleues.

Le comptage se fait au microscope optique à l'aide de lames de comptage Kova® (Glasstic® Slide 10, Hycor). A confluence, la densité de cellules viables doit être comprise entre 0,8 à $2,0 \times 10^6$ cellules / mL et le taux de cellules mortes doit être inférieur à 10%. Ces conditions sont primordiales pour réaliser le test de cytotoxicité et pour la cryoconservation.

Décongélation-Congélation

Lorsque les cellules sont à confluence et si leur taux de mortalité est inférieur à 10%, les cellules peuvent être cryoconservées dans des tubes de cryoconservation (Nunc®) à -80°C (2 ans) ou à l'azote liquide (5 ans). Le milieu de congélation est composé du milieu de culture RPMI 1640 à 40%, de SVF à 50% et de diméthyl sulfoxyde (DMSO) à 10%. Le DMSO permet d'éviter l'éclatement des cellules lors de la congélation : c'est un cryoconservateur. Mais à température ambiante, le DMSO dégrade les membranes.

Après une centrifugation de la suspension cellulaire de 5 mn à 3 000 rpm, le culot cellulaire est repris dans le milieu de congélation pour obtenir une concentration cellulaire d'environ $5 \text{ à } 7 \times 10^6$ cellules / mL réparties dans des cryotubes.

Lors de la décongélation, les cellules doivent être décongelées rapidement au bain-marie à 37°C et mises immédiatement en présence de milieu de culture complet pour diluer le DMSO et empêcher la dégradation des membranes cellulaires. Puis les cellules sont remises en culture. Le milieu est renouvelé 2 h après la mise en culture.

II.2.d.3.b.(ii) Test de cytotoxicité

Le potentiel toxique d'extraits est analysé en testant une gamme de concentrations. Ce test est développé spécifiquement pour la détection des toxines agissant sur les CSSP. Sa sensibilité se trouve augmentée grâce à l'utilisation des deux composés : ouabaïne et vératridine.

Potentialisateurs de membrane

Les potentialisateurs utilisés sont la vératridine (V) et l'ouabaïne (O) (figure 27). Ils augmentent la sensibilité du canal sodique des cellules.

La **vératridine** est un alcaloïde liposoluble qui stimule l'entrée de Na⁺ dans la cellule en se fixant au site 2 du CSSP. L'**ouabaïne** est un glycoside cardiaque, intervenant dans la

perméabilité des cellules. Plus spécifiquement, c'est un inhibiteur de l'ATP-ase $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ qui bloque les pompes $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ cellulaires. L'action combinée de ces deux composés réduit la viabilité cellulaire par l'entrée massive d'ions Na^+ dans le compartiment intracellulaire.

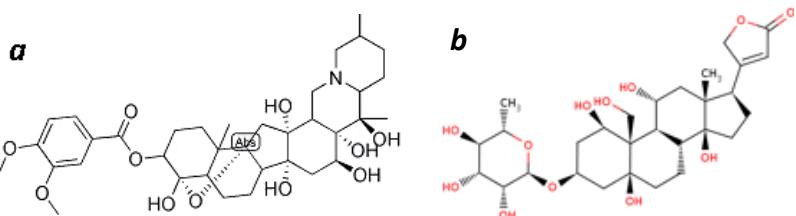


Figure 27 : Structures chimiques de la vératridine (a) et de l'ouabaïne (b).

Le test se déroule en trois étapes : (1) ensemencement des cellules, (2) mise en contact avec les extraits et les toxines, (3) lecture des résultats :

Etape 1 : Ensemencement des cellules

Les cellules sont ensemencées à raison de $2,5 \times 10^5$ cellules / mL dans des microplaques de 96 puits (Corning) et incubées 24 h à 37°C, sous atmosphère enrichie en CO_2 à 5%. Le volume final des puits est de 200 μL . Les puits situés à l'extérieur sont remplis avec 200 μL d'eau afin d'isoler les puits intérieurs et constituent les « blancs ».

Etape 2 : Préparation des plaques

Le milieu est enlevé par retournement des microplaques et renouvelé afin qu'il ne soit pas un facteur limitant de la croissance et de la réponse cellulaire. Dans un premier temps, 100 μL de milieu sont ajoutés dans chaque puits intérieur. L'eau des puits extérieurs est renouvelée (200 μL). Les toxines et extraits à tester sont solubilisés dans du MeOH à une concentration de 5 mg / mL. Une gamme de 7 concentrations est réalisée par dilutions en cascade à l'eau distillée (S1 à S7) pour les extraits liposolubles (4 à 250 μg d'extrait / mL) et les extraits liposolubles purifiés sur Sep-Pak® exprimées en équivalent (eqv) de matière (10 à 625 μg eqv d'extrait purifié / mL). Des préparations correspondant à chaque condition d'essai sont préparées extemporanément dans des volumes de 100 μL , ajoutées et testées en triplicat ($n = 3$). Les concentrations de O et de V appliquées sont les suivantes : 10 μL par puits de O à 10mM (soit 500 μM) et 10 μL de V à 1 mM (soit 50 μM). Les extraits sont testés soit en présence soit en l'absence de ces potentialisateurs (respectivement (+OV) et (-OV)).

Les conditions et le nombre de réplicats sont les suivants:

- MS : cellules seules, $n = 10$,
- OV : cellules avec OV, $n = 10$,
- S1-OV à S7-OV : cellules en présence de différentes concentrations d'extraits ou de toxines, mais sans potentialisateurs, $n = 3$ (à l'exception de S7-OV où $n = 2$),

- S1+OV à S7+OV : cellules en présence de différentes concentrations d'extraits ou de toxines, avec potentialisateurs, n = 3 (à l'exception de S7+OV où n = 2).

En pratique, si la toxicité observée en conditions (+OV) est significativement différente de celle enregistrée en conditions (-OV), il sera possible d'aller plus avant dans l'identification des molécules actives : une diminution de la viabilité cellulaire sera en faveur de la présence de toxines activatrices des CSSP (ex. : CTXs ou PbTxs) alors qu'une augmentation de la viabilité cellulaire indiquera plutôt la présence de toxines inhibitrices des CSSP (ex. : STXs ou TTX). A contrario, si une cytotoxicité identique est observée en conditions +OV et -OV, l'extrait sera considéré comme toxique mais son effet cytotoxique non lié à une action sur les CSSP.

Le volume final de chaque puits est ajusté à 200 µL avec du RPMI complet. Le schéma de plaque est représenté en figure 28. Les microplaques sont ensuite incubées à 37°C pendant 14 h.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		MS										
C		OV										
D		S1 - OV		S2 - OV		S3 - OV		S7 - OV				
E		S4 - OV		S5 - OV		S6 - OV						
F		S1 + OV		S2 + OV		S3 + OV		S7 + OV				
G		S4 + OV		S5 + OV		S6 + OV						
H												

Figure 28 : Schéma de plaque pour le test de cytotoxicité.

Etape 3 : Lecture au MTT

La viabilité cellulaire est quantifiée par la méthode colorimétrique au MTT. Le 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) est un sel de tetrazolium soluble dans l'eau (jaune) qui se transforme en formazan (violet) sous l'action d'enzymes déshydrogénases actives, NADP(H)-dépendantes du réticulum endoplasmique chez les cellules vivantes (Mosman, 1983 ; Berridge *et al.*, 1993).

Après 14 h d'incubation, le milieu est enlevé par retournement des microplaques. 50 µL de solution de MTT (0,8 mg / mL en PBS) sont ajoutés dans chaque puits (extérieur et intérieur). Les microplaques sont de nouveau incubées pendant 1 h à 37°C. Les sels se réduisent en formazan proportionnellement au nombre de cellules vivantes.

Enfin, l'ajout de 150 µL de DMSO permet de solubiliser les cristaux de formazan, les microplaques sont incubées une dernière fois à 37°C. Au bout d'1 h, une agitation (5 mn à 700

rpm) permet d'homogénéiser la solution. La lecture de l'absorbance s'effectue à la longueur d'onde de 490 nm : elle est proportionnelle au nombre de cellules vivantes et inversement proportionnelle à la toxicité de l'extrait. Le spectrophotomètre utilisé est l'Universel Plate reader ELX 800 de Bio-tek Instruments. Par comparaison aux témoins (cellules seules, MS et cellules avec OV), les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité cellulaire par rapport au témoin.

II.2.d.3.c Analyses et traitements des données

La concentration inhibitrice à 50% (Cl_{50}) est une mesure de l'efficacité d'un composé donné à inhiber la viabilité cellulaire. Ces valeurs exprimées en mg d'extrait / mL ou mg équivalent d'extrait / mL, sont retenues pour évaluer la toxicité d'un extrait. Les Cl_{50} sont calculées à l'aide du logiciel Graphpad prism v.5, à partir des courbes de régression sigmoïdale, gamme de 7 concentrations ($n = 3$) testées trois fois indépendamment ($N = 3 \times 3$). Le coefficient de régression (R^2) et le coefficient de Hill¹ caractérisant la régression, permettent de valider chacune des valeurs de Cl_{50} .

Enfin, l'effet spécifique de la toxicité pour les CSSP traduit par la « différence » entre les courbes de régression est évalué par analyse de la variance à deux facteurs à l'aide du logiciel Graphpad prism v.5.

II.2.d.4 Test RBA

II.2.d.4.a Principe

Ce test est basé sur la compétition entre des composés non marqués (les compétiteurs) et la PbTx marquée au tritium ($[^3H]PbTx-3$) (le radioligand) ayant des affinités différentes pour un même récepteur spécifique, le site 5 du CSSP de synaptosomes de cerveaux de rat (figure 29). La diminution de la radioactivité qui traduit le déplacement de la ($[^3H]PbTx-3$) est mesurée au compteur à scintillation liquide et est inversement proportionnelle à la teneur d'un extrait en compétiteurs (ex : CTXs) se fixant sur ce site 5 des CSSP (le complexe). Les avantages et inconvénients de ce test sont présentés dans le chapitre 1 (cf. ch1.II.6.b.1.c).

La totalité des analyses de toxicité par test RBA présentées dans cette thèse est réalisée au laboratoire des Microalgues Toxiques de l'ILM par le Docteur Taiana H. Darius.

¹ Le coefficient de Hill est défini par la tangente à la pente maximale de la courbe. Il caractérise l'inflexion de la courbe de régression.

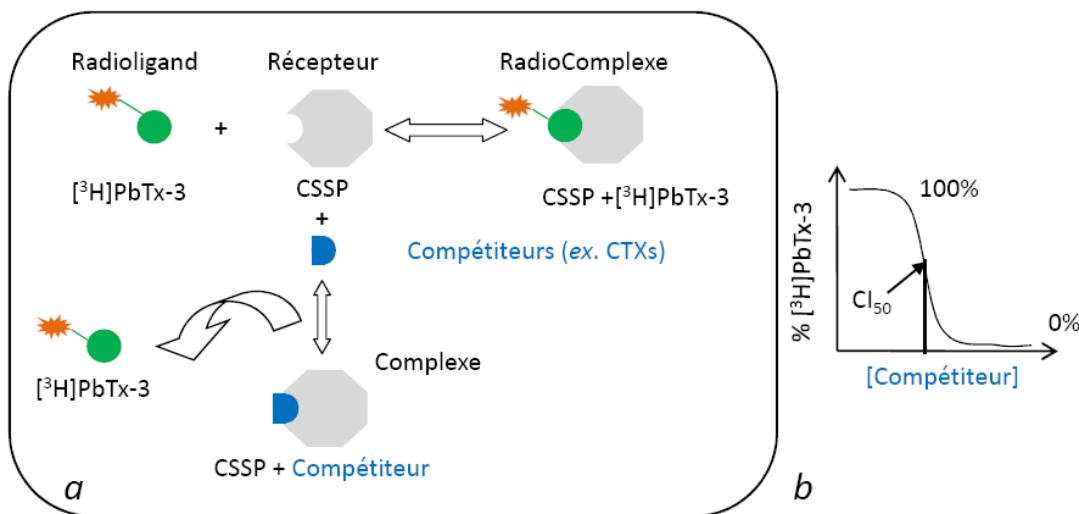


Figure 29 : Test RBA, (a) Principe du test RBA basé sur la compétition entre un radioligand et un composé d'affinité différente pour un même récepteur ; (b) Courbe de compétition permettant de calculer la concentration d'inhibition à 50% (CI₅₀) (D'après Dechraoui-Bottein, 1999).

II.2.d.4.b Matériels et méthodes

Préparation des synaptosomes de cerveaux de rat.

La méthode permettant la préparation des synaptosomes de rat est décrite par Dechraoui-Bottein (1999). Brièvement, les hémisphères cérébraux du rat adulte sont extraits et broyés au mortier dans une solution tampon. Les broyats obtenus sont centrifugés afin de débarrasser l'homogénat de tissus cérébraux, des noyaux, des débris cellulaires, mitochondries, microsomes, des ribosomes et des fragments de myéline. Trois centrifugations successives permettent ainsi d'isoler les synaptosomes qui sont récupérés, la solution est homogénéisée et conservée dans un tampon d'incubation à -80°C.

Dosage des protéines totales par la méthode de Bradford

La quantité de synaptosomes utilisée lors de l'expérimentation est évaluée par le dosage de protéines selon la méthode adaptée de Bradford (Dechraoui-Bottein, 1999). En général, la quantité de protéines finales utilisée est comprise entre 60 et 120 µg / mL.

Evaluation de la qualité des synaptosomes pour le test d'interaction ligand-récepteur

Le test RBA est réalisé en format fioles (Perkin Elmer Betaplate) selon le protocole décrit par Darius *et al.* (2007). La ³H-PbTx-3 utilisée est synthétisée par la société GE Healthcare Europe GMBH (France) : sa radioactivité spécifique est de 14 Ci / mmol (18,5 MBq / mmol) et sa pureté radiochimique déterminée par HPLC proche de 99%. Cette solution est conservée à -80°C.

Les dilutions nécessaires à l'expérimentation sont effectuées extemporanément. Les expériences de fixation spécifique sur les synaptosomes de cerveaux de rats sont réalisées dans un tampon d'incubation à pH 7,4 contenant 130 mM de choline chloride, 50 mM de HEPES, 5 mM de glucose, 5,4 mM de KCl, 0,8 mM de MgSO₄, de l'émulphore à 0,01%, et de la BSA à 1 mg / mL, dans un volume final de 500 µL.

Des concentrations croissantes d'extraits liposolubles sont mises à incuber en présence de [³H]-PbTx-3 (1 nM) (gamme à partir d'un équivalent de 5 mg d'extraits liposolubles, les 8 concentrations testées varient de 3×10^{-3} à 1 mg / 500 µL). Après 1 h d'incubation à +4°C, la réaction est déposée sur des filtres GF/C (Whatman) prétraités avec une solution de polyéthylenimine 0,1% (polymère cationique favorisant l'attachement des membranes cellulaires portant des charges négatives en surface). La réaction est ensuite filtrée avec du tampon de lavage contenant 163 mM de chlorure de choline, 5 mM de HEPES/Tris (pH 7,4), 1,8 mM de CaCl₂ et 0,8 mM de MgSO₄. Les complexes synaptosomes-[³H]-PbTx-3 et les complexes synaptosomes-compétiteurs sont ainsi recueillis sur les filtres qui sont déposés dans des fioles de comptage contenant 2 mL de liquide scintillant (Perkin Elmer Betaplate).

Lecture

La radioactivité recueillie sur les filtres est mesurée pendant 4 mn à l'aide d'un compteur à scintillation (Perkin Elmer Microbeta Trilux 1 450, Waltham, MA, USA).

Validation et calibration du dosage

La fixation non spécifique est déterminée par des incubations en parallèle, faites en présence d'un excès de ligand PbTx-3 non marquée (0,67 µM). Cette valeur est soustraite aux valeurs de fixation totale afin d'obtenir la **fixation spécifique**. Chaque concentration d'extrait est testée en dupliquat.

Enfin, la P-CTX-3C est utilisé comme **standard interne** (calibration du test) pour vérifier la reproductibilité du test d'un essai à l'autre et permettre d'exprimer les résultats en ng équivalent P-CTX-3C / g de chair ou d'extrait.

II.2.d.4.c Analyse et traitement des données

La toxicité des extraits est évaluée par la concentration inhibitrice à 50% (CI₅₀): quantité nécessaire pour déplacer 50% de la [³H]-PbTx-3, elle est exprimée en µg / mL d'extrait de cyanobactérie ou d'extrait de bénitier. Cette valeur est calculée par le logiciel Graphpad Prism v 4.1. Les CI₅₀ des extraits sont également comparées à une courbe-étalon de P-CTX-3-C pure extraite de cultures de *G. polynesiensis* (TB-92) afin d'exprimer les valeurs en « µg ou g eqv de P-CTX-3C / g d'extrait ». Cette conversion permet de comparer ces résultats à des études précédentes (Darius *et al.*, 2007).

II.3 Résultats

Afin d'avoir une vue d'ensemble de l'étude effectuée sur la zone de Lifou, certaines données antérieures à 2007 (avant le début des travaux de thèse) sont reprises dans la présentation des résultats, notamment celles concernant le suivi écologique de 2005 à 2007 et les échantillons récoltés lors de ces missions dont l'extraction et l'analyse toxicologique ont été effectuées dans le cadre de cette thèse.

Le tableau suivant synthétise les missions effectuées à Lifou depuis 2005 à différentes périodes de l'année : saison froide (bleu) et saison chaude (rosé) (tableau 13) avec les différents échantillons (cyanobactéries (récolte de « masse »), bénitiers et poissons) récoltés à cette occasion (pour identification et/ou analyses toxicologiques). Les cyanobactéries sont récoltées en masse lorsque les quantités le permettent et les bénitiers et des poissons sont collectés annuellement (février 2007, 2008 et 2009) selon la méthode de suivi décrite précédemment.

Tableau 13 : Missions effectuées à Lifou de 2005 à 2010 : nom, date et nature de l'échantillonnage.

Année	Nom mission	Date	Température °C	Echantillons récoltés			
				Cyanobactérie	Bénitier	Poisson	
2005	L1	15/03/2005	-	✓	✓	✓	
	L2	28/04/2005	-	✓	✓	✓	
	L3	15/11/2005	26	✓	✓	✓	
2006	L4	09/02/2006	28				
	L5	28/03/2006	26	✓	✓		
	L6	29/05/2006	26	✓			
	L7	07/08/2006	22	✓			
	L8	22/11/2006	27				
2007	L9	19/02/2007	27	✓	✓	✓	
	L10	08/08/2007	23				
	L11	06/11/2007	26				
2008	L12	12/02/2008	28	✓	✓	✓	
	L13	06/06/2008	24	✓			
	L14	04/11/2008	27	✓			
2009	L15	18/02/2009	27			✓	
	L16	13/08/2009	23	✓			
	L17	18/11/2009	25	✓			
2010	L18	06/04/2010	26	✓			

II.3.a Données épidémiologiques

Aucune intoxication n'a été déclarée au dispensaire depuis l'étude épidémiologique initiée en 2005. Mais il est fort probable que des cas d'intoxications sévissent toujours mais ne soient pas déclarés pour des questions de droits tribaux, le chef de la tribu ayant expressément demandé à la population de ne plus pêcher dans la ZT dès le début de notre étude, et de se cantonner à la ZNT. Ceci s'est vérifié lors de discussions ultérieures avec les habitants d'Hunëtë, qui nous ont signalé au moins deux cas d'intoxications avec recrudescence de symptômes ciguatériques après consommation de poissons (espèces non définies) pêchés en ZT. Comme nous avons pu le souligner dans le premier chapitre, il est difficile d'évaluer l'impact réel des intoxications ciguatériques sur la santé des populations.

II.3.b Données écologiques : évolution spatio-temporelle

II.3.b.1 Description géomorphologique

L'ensemble des ZT et ZNT s'étend le long de la côte sur près d'1 km. Relativement homogène sur le plan géomorphologique, elle se compose d'une large dalle corallienne de 200 à 350 m de large, d'une profondeur de 0,5 à 5 m de profondeur (photos 24 et 26). Cette unité géomorphologique est nommée « plate-forme de lagon d'atoll surélevé » selon la classification recueillie dans l'atlas des récifs de Nouvelle-Calédonie (Andréfouët et Torres-Pulliza, 2004).

Le type de fond est dur et sableux (sable fin) parsemé de coraux massifs (*Porites*) et de coraux branchus (*Acropora*) (photos 25 et 27). Ces constructions coraliennes recouvrent près de 75% de la surface dans la bande littorale des 100 m et sont plus parsemées, avec un pourcentage de recouvrement d'environ 25 à 30%, au-delà des 100 m et dans la limite extérieure de la zone.

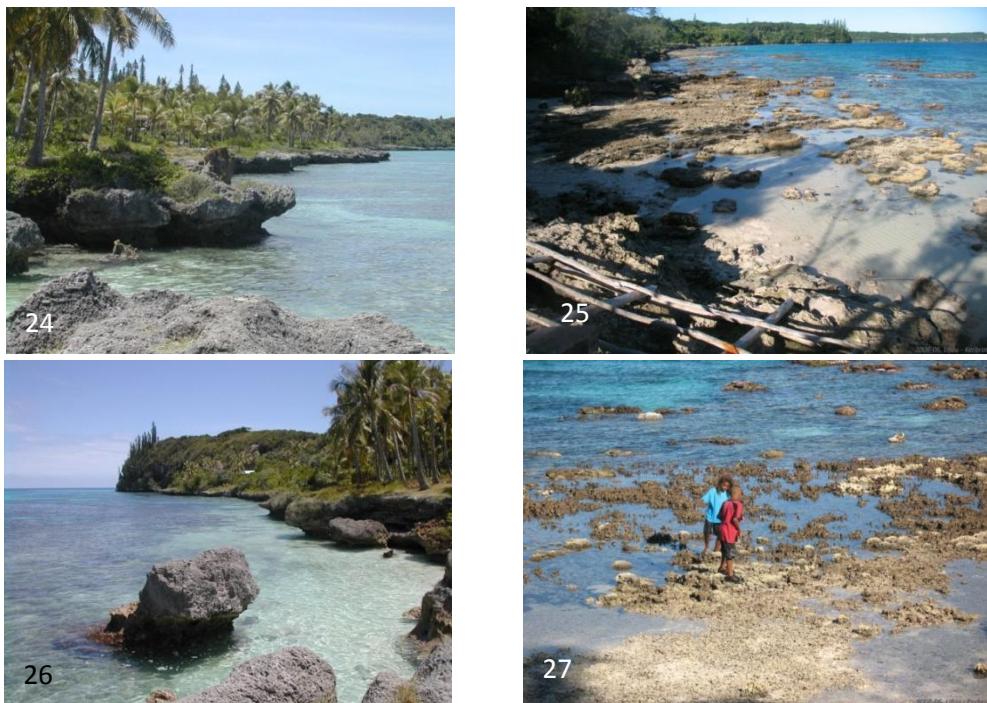
Lors des marées de grandes amplitudes, l'estran émergé est exposé à de fortes variations de températures (figure 30) : la température moyenne minimale enregistrée est de 22,4°C en juillet (saison froide) et maximale de 30,7 °C en janvier (saison chaude). Les valeurs maximales atteintes (31,6 °C et 38,3 °C) sont liées aux grandes marées basses, période de la journée où le capteur de température est émergé.

II.3.b.2 Caractéristiques des deux zones

La particularité de la ZT par rapport à la ZNT concerne les grandes étendues de coraux branchus dégradés ou morts. La ZNT est quant à elle riche en coraux et en poissons (quantitativement et en diversité) : visuellement elle semble plus saine.

Au niveau de la ZT, une rampe de mise à l'eau a été construite perpendiculairement à la côte et est exposée aux alizés. Dans cette zone, les surfaces coraliennes les plus abimées se

trouvent au pied de cette mise à l'eau. Construite en 1999, elle a fortement été dégradée en 2005 par des pluies diluviales (photo 28) : depuis, celle-ci a été réaménagée (photo 29).



Photos 24, 25, 26 et 27 : Vues de la ZNT (24) et ZT (25) à marée haute (26) et à marée basse (27) de grande amplitude.

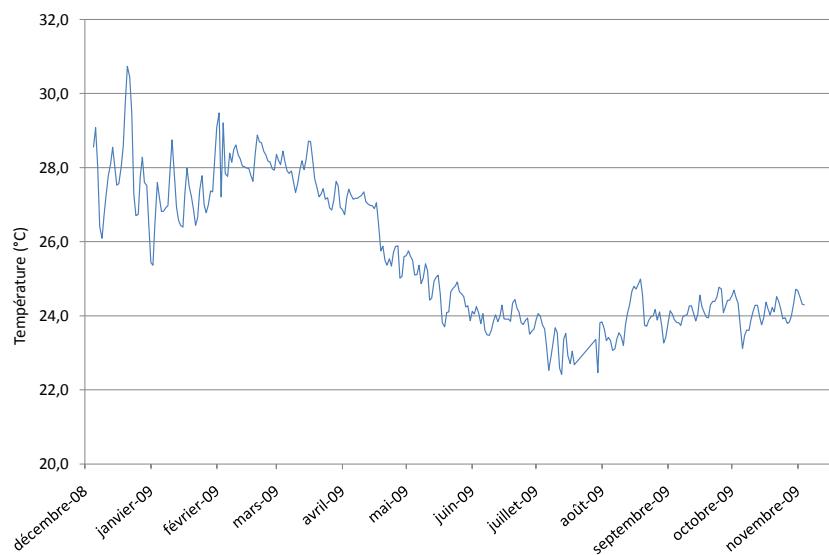


Figure 30 : Evolution annuelle (12/2008 à 12/2009) des températures moyennes quotidiennes de l'eau en ZT (5A) (sonde immergée à 1 m de profondeur environ).



Photos 28 et 29 : Etat de la rampe de mise à l'eau au niveau de la ZT, prises de vue en avril 2005 (28) et en février 2009 (29).

II.3.b.3 Présence des dinoflagellés ciguatoxinogènes

Les observations microscopiques des microorganismes épiphytiques des ZT et ZNT sont résumées dans le tableau 14. La concentration moyenne de cellules de *Gambierdiscus* est exprimée en nombre par mL. A titre indicatif, une situation d'efflorescence est déclarée à partir d'une densité cellulaire $> 1\,000$ cellules / g d'algues supports (Chinain *et al.*, 1999), ce qui correspondrait dans le cas présent à des densités de l'ordre de 80 000 cellules par mL considérant la masse moyenne d'algue ou de coraux prélevée.

Des cellules de *Gambierdiscus* ont été observées ponctuellement sur le site de Hunëtë. Un nombre maximum de 300 cellules / mL en juin 2008 (zone 4B ; T°C environ 24°C) traduit la présence naturelle de ces dinoflagellés dans la zone. Lorsque ceux-ci sont observés, ils se retrouvent plus fréquemment en bande côtière (transects A et B). Cependant, aucune efflorescence et aucune différence entre la ZNT et ZT n'a été observé.

Les photos 42 (a, b, c) illustrent les observations microscopiques effectuées en mars 2006 (L6), avec la présence de cellules de *Gambierdiscus* associées à des filaments cyanobactériens en zone 2A, et en novembre 2008 (L14), avec la diversité des filaments cyanobactériens en ZT.

En ce qui concerne, les dinoflagellés des genres *Prorocentrum* ou *Ostreopsis*, ils n'ont été observés dans aucune des zones depuis 2005. A noter cependant qu'une efflorescence importante d'*Ostreopsis* recouvrant de nombreuses *Turbinaria* avait été observée lors d'une première mission d'observation en 2004 dans la ZNT et plus exactement en position 3A.

Dans ces échantillons, la présence de cyanobactéries est relevée régulièrement. Il s'agit majoritairement de filamenteuses benthiques de l'ordre des Oscillatoriales (trichomes non-hétérocystés) dont les tailles sont variables : la largeur des cellules est comprise entre 0,5 à 20 µm (photos 30b et 30c). Sans corrélation avec les efflorescences macroscopiques observées, les cyanobactéries sont présentes naturellement dans cet écosystème. Seul le genre des

cyanobactéries majoritaires est déterminé en conditions d'efflorescence, c'est-à-dire quand des mattes de cyanobactéries sont visibles à l'œil nu (ch2.II.3.b.5).

Tableau 14 : Densités cellulaires de *Gambierdiscus* (cellules / mL) observées par transects de prélèvements pendant toute la période d'étude (mars 2005- avril 2010) (0 : absence de cellules de dinoflagellés)

Date		ZNT									ZT								
		1			2			3			4			5			6		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
2005	Avril L2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Novembre L3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Février L4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mars L5	-	-	-	50	0	0	50	50	50	0	50	-	50	50	0	0	0	50
2006	Mai L6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Août L7	0	0	0	250	0	0	150	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
	Novembre L8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Février L9	0	0	-	0	0	0	0	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2007	Août L10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Novembre L11	-	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Février L12	100	0	0	0	0	0	50	0	0	50	0	0	0	0	0	0	0	0
2008	Juin L13	100	0	0	100	0	0	100	0	0	200	300	0	50	0	0	0	0	0
	Novembre L14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Février L15	0	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2009	Août L16	0	50	0	150	0	0	0	0	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Novembre L17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2010	Avril L18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



Photos 30 : Cellules de *Gambierdiscus* (a, *200) et filaments de cyanobactéries (b, *10 et c, *40) observées au microscope optique.

En novembre 2009 (L17), une efflorescence « inhabituelle » de diatomées centriques est observée en zone 6A (1 m de profondeur, 25°C), celle-ci n'est plus observée en avril 2010 (L18), et par la suite. L'algue support appartient au genre *Dictyota*. La fraction observée comprise entre 45 µm et 250 µm (photo 31a) est dominée par deux espèces de diatomées : (i) l'une est identifiée morphologiquement comme *Isthmia enervis* et (ii) l'autre est une diatomée centrique, non identifiée, d'ornementation très fine nécessitant un traitement particulier pour son identification (photo 31b).

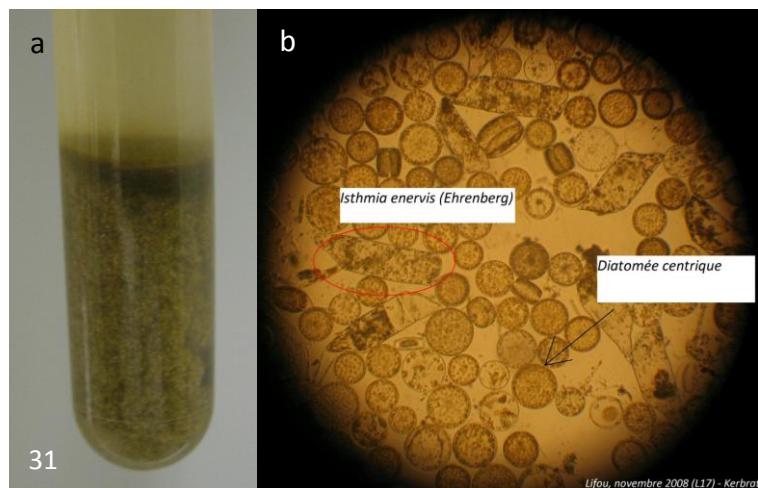


Photo 31 : Fraction 45 à 250 µm (a) de la zone 6A récoltée en novembre 2007 (L17) dans laquelle une efflorescence de diatomées est observée au microscope (*200) (b).

Située aux pieds de la côte constituée de roche calcaire, cette zone peut être sujette localement à des résurgences d'eau douce qui peuvent influencer la salinité et de ce fait expliquer une apparition soudaine de ces diatomées qui serait de plus favorisée par des conditions optimales de la saison chaude (température, lumière). D'après les spécialistes (dont Bruno Delesalle de l'EPHE de Perpignan), ce groupe de diatomés ne présenterait pas de risques quant à une production toxinique, mais nous ne pouvons l'affirmer. En outre, de par cet état d'efflorescence, elles peuvent éventuellement jouer sur l'équilibre des populations de microorganismes avec lesquelles elles rentrent en compétition de substrat.

II.3.b.4 Evolution écologique de la zone d'étude

Les informations écologiques suivantes sont issues des observations « terrain » faites en plongée libre. Les photographies sont des supports utilisés pour évaluer les caractéristiques de l'état des récifs.

II.3.b.4.a De 2005 à 2007 (L1 à L9)

Les observations sous-marines de la zone d'étude ont permis de mettre en évidence une dégradation concentrique décroissante du milieu corallien, au niveau de l'affaissement de la route et du wharf. En effet, sur le lieu de l'effondrement, on observe une zone d'une vingtaine de mètres de diamètre où sont présents des coraux branchus cassés recouverts de gazon algal brun. Le retour progressif de la diversité corallienne est notable au-delà des 100 m autour de cette zone détruite.

Au milieu de la zone dégradée, le tapis de cyanobactéries constitué d'*Hydrocoleum* observé dès la première mission en mars 2005 (photo 32) et lors des missions suivantes jusqu'à la fin de la saison chaude en 2006 (photos 33 et 34), recouvre largement le centre de la ZT (5A à 5B, de 0 à 3m).



32

Photo 32 : Mattes de cyanobactéries (*Hydrocoleum lyngbyaceum*) observées lors de la première mission en mars 2005.



33

2005/11/06 - Kerbrau - Kerbrau



34

2005/11/06 - Kerbrau - Kerbrau

Photos 33 et 34 : Couverture d'*Hydrocoleum* en ZT de 5A, à 5B et de 6A à 6B observée lors de la mission de novembre 2005 (L3).



35

L6 5A



36

L6 5B

Photos 35 et 36 : Couvertures de cyanobactéries, *Oscillatoria subuliformis* recouvrant la zone 5A et 5B en mai 2006.



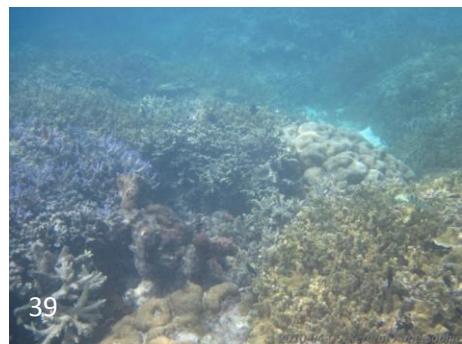
Photos 37 et 38 : Couverture de *Spirulina weissii* en ZT (4A) observée lors de la mission de mai 2006 (L6) ; Vue rapprochée de cette Oscillatorielle.

Cette zone dégradée est par la suite recouverte successivement de cyanobactéries filamenteuses du genre *Oscillatoria* et *Phormidium*, tous deux appartenant à l'ordre des Oscillarioles, comme *Hydrocoleum* (photos 35 et 36).

Il est intéressant de noter en ZT l'absence quasi-totale de macroalgues présentes lors de la première mission en 2005, la faible diversité corallienne, les faibles populations de poissons et l'absence de *S. chloronotus*.

II.3.b.4.b 2008 (L12, L13 et L14)

En ZNT, l'écosystème récifal est sain et pourvu d'une diversité corallienne et pisciaire riche (photo 39). La présence de divers tapis de cyanobactéries dispersés et réduits est la preuve de son équilibre (photos 40 et 41).



Photos 39, 40 et 41 : Vues sous-marines de la ZNT (39) et patchs localisés de cyanobactéries (non déterminées) (40 et 41).

Cependant, dans cette ZNT, on peut noter au pied de la mise à l'eau des pirogues, site 2A (photo 25), sur un périmètre relativement limité (demi-cercle de 20 m de rayon), une fragilité des coraux probablement due à l'impact de l'Homme utilisant cette facilité d'accès pour mettre à l'eau les petites embarcations. Un tapis réduit de cyanobactéries cf. *Hydrocoleum* (non identifiée) recouvre les débris coralliens (photo 42).



42

2009-04-06, Kerbiri Anne-Sophie

Photos 42 : ZNT, pied de la mise à l'eau des pirogues (site 2A) où l'on peut observer une fragilité des coraux, associée à un développement localisé de cyanobactéries du genre *Hydrocoleum*.

Quant à la ZT, sur les trois missions de l'année 2008, les surfaces dégradées restent toujours impactées sur une zone de 50 m tendant vers le large et de 50 m de part et d'autre de la rampe de la mise à l'eau, site 5A et 5B. Nous pouvons observer toujours de nombreux débris coralliens recouverts de gazons encroûtant mixtes entre les massifs de *Porites*. La zone est riche en poissons (diversité et quantité) : on y observe des picots, des perroquets, des becs de cane et la réapparition d'holothuries (*Stichopus* sp.). Cette diversité pisciaire ainsi que le comportement des poissons sont caractéristiques d'une zone mise sous réserve dont la pression de pêche est quasiment nulle. En effet, la zone est coutumièrtement interdite à la pêche depuis environ trois ans.

Les mattes de *S. weissii* et d'*Hydrocoleum* sont toujours présentes, localisées en zones 4B et 5A, respectivement (photos 43 et 44). Les surfaces restent importantes et le passage à la saison fraîche ne semble pas modifier leur présence (juin 2008, L13).



43



44

Photos 43 et 44 : Recouvrement de *S. weissii* (site 4B) et d'*Hydrocoleum* (site 5A) en juin 2008 (L13).

Lors de la saison chaude, en novembre 2008 (L14), l'ensemble de ces tapis s'est fortement clairsemé : la surface de *S. weissii* est alors de l'ordre de 25 m x 25 m, quant à la zone sableuse, elle s'est complètement nettoyée de trace visible de cyanobactéries. En outre, cette mission est marquée par une efflorescence de *Trichodesmium erythraeum*, Oscillatorielle pélagique. Les conditions favorables à cette phase de développement étaient réunies : ensoleillement, température, pas de houle, peu de vent.

Enfin, une efflorescence de cyanobactéries filamentueuses benthiques de couleur mauve, identifiée comme *Hydrocoleum glutinosum*, se développe en février 2008 (L12) sur la zone 4C en limite de recouvrement de *S. weissii* (photos 45 et 46). Le maximum de recouvrement de cette dernière semble être en saison chaude et diminuer en saison froide (juin 2008, L13).



Photos 45 et 46 : Apparition d'*Hydrocoleum glutinosum* en zone 4C observée en février 2008 (L12) à la limite de la zone 5C envahie par *S. weissii* (photo 32, ligne de tiret indiquant la limite de zone).

II.3.b.4.c Depuis 2009 (L15 à L18)

Sur la période de 2009 à début 2010 (L15, L16, L17 et L18), les observations confirment l'état écologique des zones : la ZNT est saine (riche diversité corallienne et pisciaire) tandis que la ZT est remarquablement dégradée, identique aux observations précédentes.

Zone réputée toxique (ZT).

Les mattes majeures observées précédemment (*S. weissii*, 4B à 5B et « cyanobactéries noires » en 5A et 5B) sont en régression : leur surface de recouvrement et leur densité diminuent. Ainsi, à la saison chaude (février 2009, L15), la diversité cyanobactérienne de la ZT semble être retrouvée avec ces diminutions de mattes dominantes associées à l'apparition de plaques plus clairsemées sur l'ensemble de la zone.

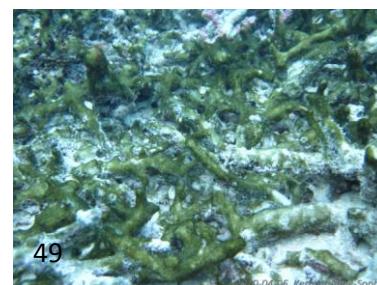
Cependant, dès février 2009 (L15), on peut noter la présence d'*O. bonnemaisonii*, (filament vert) en zones 5B et 5C se développant localement sur fond sableux (photo 47). Puis, ces mattes se développent largement avec un recouvrement d'environ 50 m x 50 m en zones 5B, 5C et 6B en août 2009 (L16) pour atteindre une surface de 100 m x 100 m (zones 5B, 5C, 6B et 6 C) à la saison chaude en novembre 2009 (L17) (photos 48 et 49). Ces mattes sont toujours présentes en avril 2010 (L18).



47



48

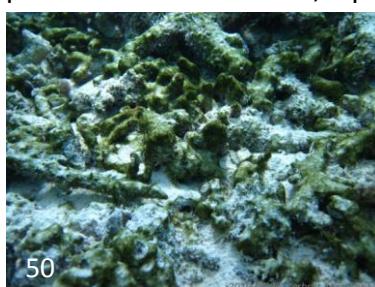


49

Photos 47, 48 et 49 : Recouvrement d'*O. bonnemaisonii*, en début de développement en février 2009 (L15) sur substrat sableux (47) et en extension en août 2009 (48 et 49).

Zone réputée non toxique (ZNT).

Les mattes d'*Oscillatoria* spp. présentées ci-dessus, sont observées également en zone dite non toxique au niveau du site 3C, à partir d'avril 2010 (L18) (photos 50 et 51).



50



51

Photos 50 et 51 : Apparition d'*Oscillatoria* spp. en 3C.

Enfin, au niveau du transect 1A, il est observé un développement d'un tapis cyanobactérien recouvrant des débris coralliens et constitué en majorité d'espèces du genre *Oscillatoria* (photos 52, 53 et 54).



52



53



54

Photos 52, 53 et 54 : Développement d'*Oscillatoria* spp. en zone (1A).

Bilan

Sur 5 années d'observation, les éléments majeurs à retenir sont :

- La **zone dite toxique** conserve son aspect fortement dégradé. Une succession de tapis cyanobactériens dominés par l'ordre des Oscillariales recouvre de larges surfaces de débris coralliens et/ou substrat sableux. Cet écosystème est en déséquilibre avec la dominance d'un groupe majoritaire, les cyanobactéries, qui semble maintenir cet état.

- La **zone dite non toxique** est saine avec une diversité pisciaire et corallienne relativement importante. Cependant, on peut noter l'apparition de mattes localisées de cyanobactéries, restreintes à certaines zones fragilisées (1A et 2A) ou en zone limite de la ZT (3C).

- En début d'étude, les ZT et ZNT sont caractérisées par un recouvrement important de champ de *Turbinaria*. Ces **Phéophycées**, connues pour constituer des supports favorables à l'installation des dinoflagellés ciguatérigènes, ne sont plus observées dès novembre 2005 (L3) et jusqu'en 2010, ou alors de manière très sporadique (quelques pieds observés ZNT).

- Les holothuries (*Stichopus chloronotus*) présentes en ZNT sont quasi-absentes en ZT.

- Sur l'ensemble du site d'étude de Hunëtë, **la bande corallienne côtière** correspondant aux transects transversaux A, apparaît fragilisée. Plusieurs raisons peuvent expliquer le maintien de cette fragilité : apport d'eau douce, fort hydrodynamisme de par la proximité avec le récif soulevé (brisant de vagues), exposition directe aux alizés et enfin bord du platier pouvant être sujet aux dégradations anthropiques notamment lors de la pêche à pied (photo 27).

II.3.b.5 Diversité cyanobactérienne

Le suivi environnemental du site d'étude de Hunëtë a permis de mettre en évidence une diversité cyanobactérienne importante considérant la fréquence à laquelle les prélèvements ont pu avoir lieu.

Les cyanobactéries dominant en termes de biomasse ont été prélevées pour l'identification de la ou les espèces majoritaire(s) et pour les analyses toxicologiques. Le tableau 15 synthétise, par date, les espèces collectées et identifiées selon la classification botanique (genre et espèce). Les zones de recouvrement sont spécifiées ainsi que les cyanobactéries pour lesquelles les quantités collectées ont permis l'analyse toxicologique.

Comme précisé précédemment, en termes de présence et de diversité de cyanobactéries, l'ordre des Oscillariales domine sur l'ensemble de la zone de pêche. Ainsi, la figure 31 présente les proportions des genres d'Oscillariales quantifiés sur les prélèvements destinés à l'identification morphologique des mattes présentes dans la ZT. Ces valeurs ne présentent pas les proportions réelles *in natura*, mais illustrent la variabilité en genre de la communauté cyanobactérienne : *Hydrocoleum*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Trichodesmium* et *Spirulina*.

Tableau 15 : Synthèse des espèces de cyanobactéries présentes à Hunëtë pendant toute la période d'étude (mars 2005 – avril 2010).

Date	Réf.	Identification des espèces	Zones	Analyse toxicologique
2005/03/15	L1	<i>H. lyngbyaceum</i>	5A 5B	✓
2005/04/28	L2	<i>H. lyngbyaceum</i>	5A 5B	✓
2005/11/15	L3	<i>H. cf. glutinosum</i> ; <i>O. bonnemaisonii</i> ; <i>H. holdeni</i>	4A	✓
2006/03/28	L5	<i>O. subuliformis</i> ; <i>H. glutinosum</i>	4A	✓
2006/05/29	L6	<i>O. subuliformis</i> ; <i>O. cf. bonnemaisonii</i>	5A 6A	✓
2006/08/07	L7	<i>S. weissii</i> (réf. : L7O)	4B/4C/5B/5C	✓
	L7	<i>P. laysanense</i> (réf. : L7N)	5B	✓
2006/11/22	L8	<i>H. cf. glutinosum</i>	6A	
2007/02/19	L9	<i>H. lyngbyaceum</i> ; <i>Oscillatoria</i> sp.; <i>P. laysanense</i>	6A	✓
2008/02/12	L12	<i>H. glutinosum</i>	4C	✓
2008/06/06	L13	<i>S. weissii</i> ; <i>H. lyngbyaceum</i>	4B/4C/5B/5C	✓
2008/11/04	L14	<i>T. erythraeum</i>	5A	
2009/02/28	L15	<i>O cf. bonnemaisonii</i>	5C	
2009/08/13	L16	<i>O. bonnemaisonii</i>	5C	✓
2009/11/17	L17	<i>O cf. bonnemaisonii</i> (réf. : L17C01) <i>T. erythraeum</i> (réf. : L17C02) <i>P. laysanense</i> (réf. : L17C03)	5C 5B 6A 5A 5B	✓ ✓ ✓
2010/04/06	L18	<i>Oscillatoria</i> spp. (réf. : L18C01) <i>O. corallinae</i> ; <i>O. laetevirens</i> (réf. : L18C02) <i>O. bonnemaisonii</i> (réf. : L18C03) <i>O. bonnemaisonii</i> (réf. : L18C04)	1A 1A 3C 5B 5C 6B 6C	

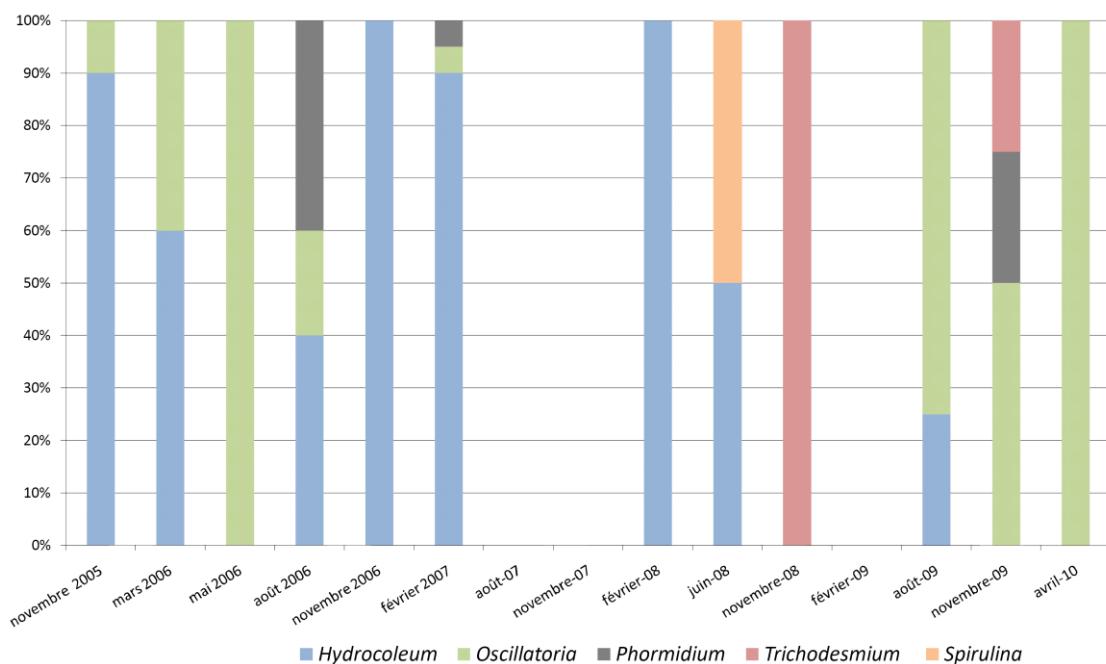
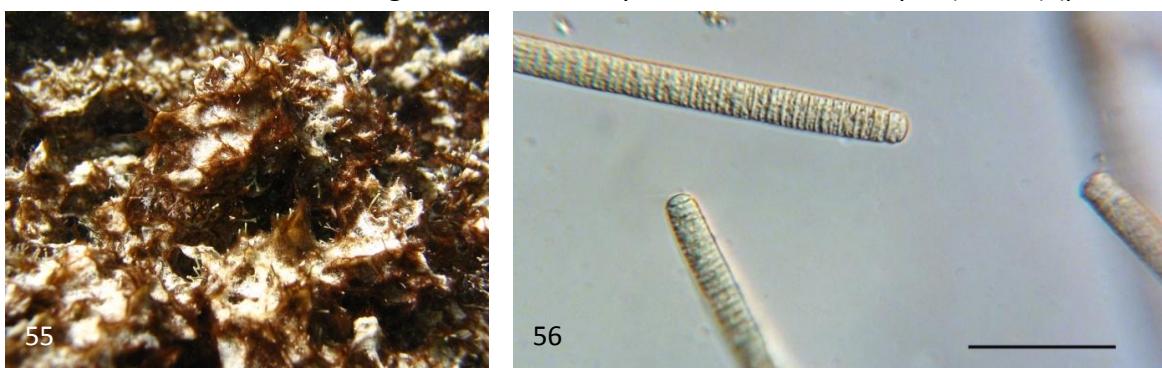


Figure 31: Diversité générique des Oscillatoires présentes en ZT (données pour août, novembre 2007 et février 2009 non disponibles).

Identification taxonomique des espèces de cyanobactéries dominantes en ZT

Le Professeur Stjepko Golubic est l'auteur de l'ensemble des vues microscopiques (à l'exception de la photo 67).

Hydrocoleum lyngbyaceum (Kützing ex Gomont, 1892) constitue avec *O. bonnemaisonnii*, l'espèce la plus fréquemment observée en ZT (L1, L2, L9, L13), plus particulièrement en zones 5A, 5B, 5C et 6A recouvrant majoritairement les débris coralliens et parfois sableux. Rencontrée indifféremment en milieu d'eau douce ou marine, les filaments de couleur noirs sont longs de 1 à 2 cm (photo 55). Sur le plan microscopique, la population récoltée en juin 2008 (L13) est constituée de trichomes de $12,73 \pm 0,47 \mu\text{m}$ de large ($n = 30$) et les cellules sont relativement longues avec une moyenne de $6,43 \pm 1,69 \mu\text{m}$ ($n = 19$) (photo 56).



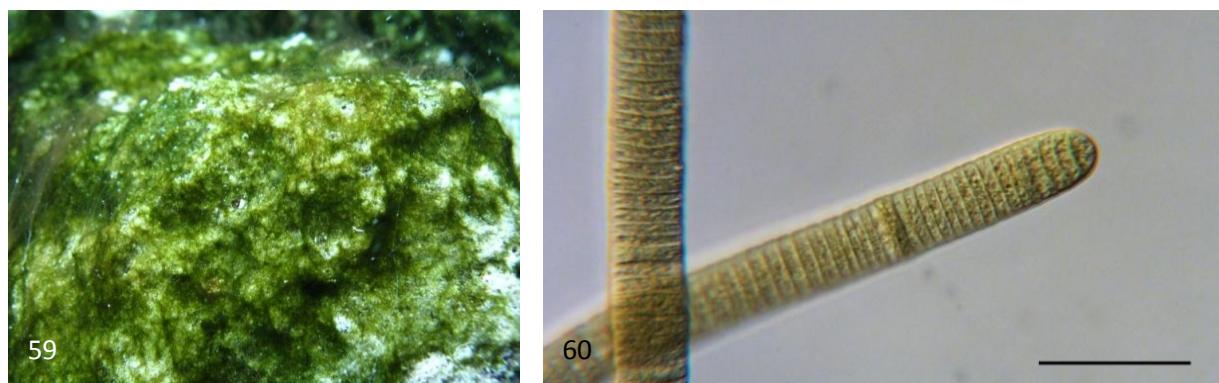
Photos 55 et 56 : Vues macroscopique (n°55) et microscopique (n°56) d'*Hydrocoleum lyngbyaceum* (Barre d'échelle = 50 µm).

Hydrocoleum glutinosum (Gomont ex Gomont, 1892) se développe de manière relativement importante en zone 4C durant la saison chaude 2008 (L12). Ces longs filaments rosés de 5 à 6 cm, arrangés en touffes, vivent sur les débris coralliens ou fixés sur certains coraux vivants (photo 57). L'échantillon prélevé en février 2008 (L12) est constituée de trichomes de $16,87 \pm 1,12 \mu\text{m}$ de large et la longueur des cellules est de $6,1 \pm 1,47 \mu\text{m}$ (photo 58).



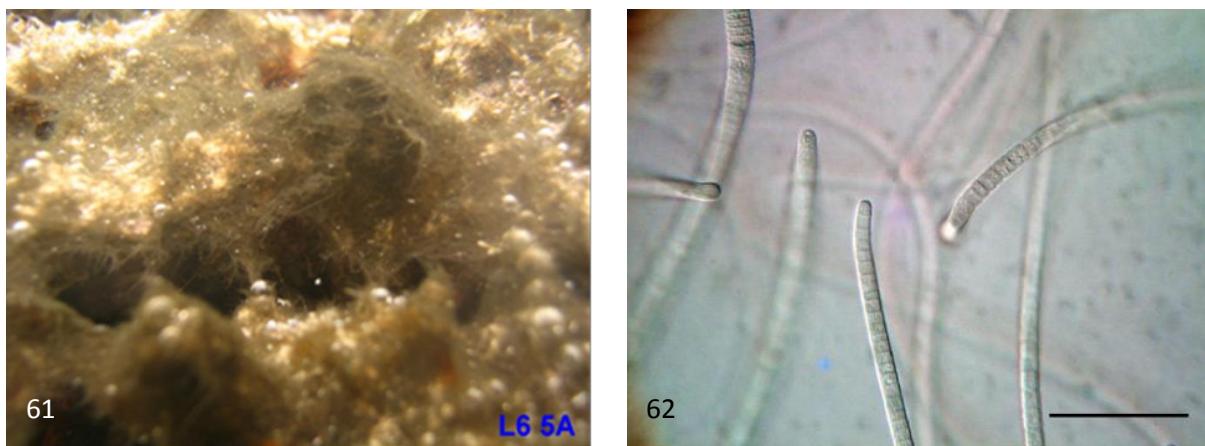
Photos 57 et 58 : Vues macroscopique (57) et microscopique (58) d'*Hydrocoleum glutinosum*
(Barre d'échelle = 50 µm).

Oscillatoria bonnemaisonii (Crouan ex Gomont 1892) constitue majoritairement le grand tapis cyanobactérien verdâtre présent dans la ZT (5B, 5C, 6A, 6B et 6C) depuis février 2008 (L15) jusqu'à avril 2010 (L18). Localisée à 4 – 5 m de profondeur, elle se développe sur substrat sableux et débris coralliens (photo 59). La population échantillonnée en novembre 2009 (L17) est composée de trichomes homogènes de $21,34 \pm 1,03 \mu\text{m}$ de large ($n = 15$) et de cellules de $4,64 \pm 1,34 \mu\text{m}$ de longueur ($n = 39$) (photo 60).



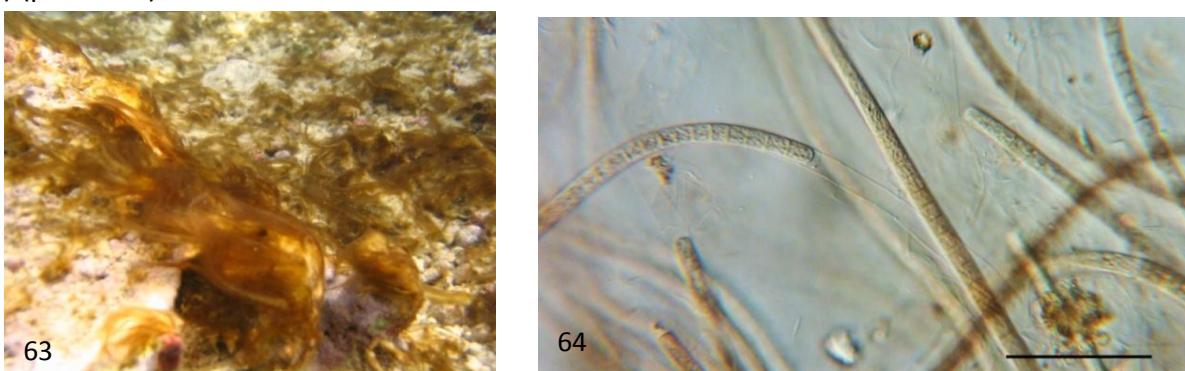
Photos 59 et 60 : Vues macroscopique (59) et microscopique (60) d'*Oscillatoria bonnemaisonii*
(Barre d'échelle = 50 µm).

Oscillatoria subuliformis (Kützing ex Gomont 1892) est présente en zones 5A et 5B en saison chaude 2007 (L5 et L6). Des tapis localisés, de surface restreinte, sont observés régulièrement dans la ZT. Les fins filaments constituent des biofilms noirâtres et ras de 2 à 3 cm (photos 61 et 62).



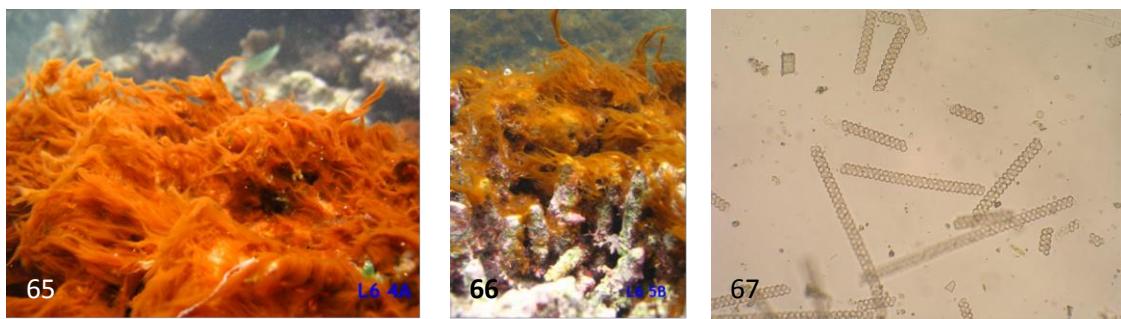
Photos 61 et 62 : Vues macroscopique (61) et microscopique (62) d'*Oscillatoria subuliformis* (Barre d'échelle = 50 µm).

Phormidium laysanense (Lemmermann, 1905) est rencontrée sous forme de grande surface en août 2006 (L7) en zone 5B, puis en novembre 2009 (L17) en zone 5B où la matte est alors beaucoup plus restreinte. Constituant de longs filaments brunâtres de 6 – 7cm, cette espèce, fréquente dans les eaux marines, se développe majoritairement sur substrats sableux (photo 63). Les gammes de formes et de couleurs décrites dans la littérature sont très variables (orange, rouge à noire). La population échantillonnée en novembre 2009 est constituée de trichomes de $6,25 \pm 0,07$ µm de large ($n = 11$) et de cellules de $8,46 \pm 1,93$ µm de longueur ($n = 30$) (photo 64).



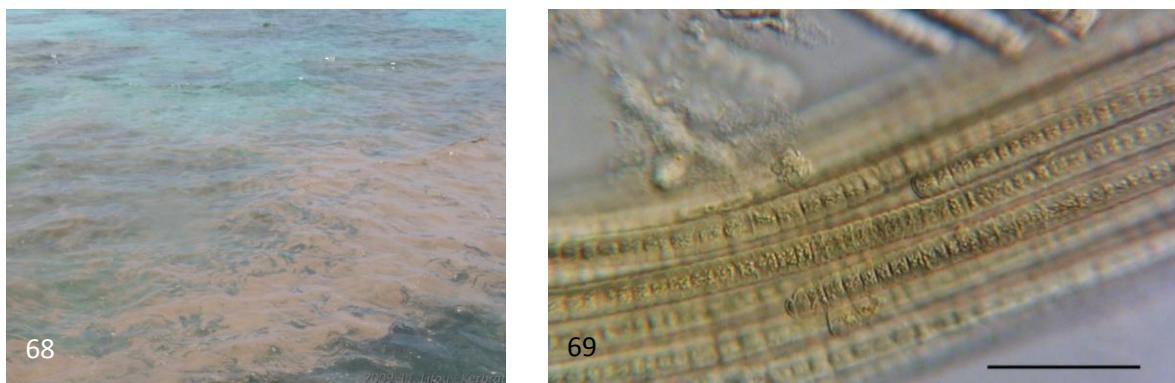
Photos 63 et 64 : Vues macroscopique (63) et microscopique (64) de *Phormidium laysanense* (Barre d'échelle = 50 µm).

Spirulina weissii (Drouet 1942) domine les populations microbiennes benthiques sur une grande surface en ZT (4B, 4C, 5B et 5C), elle est présente depuis 2006 avec un pic de dominance en saison 2008 (L12 et L13). Les populations constituent de denses tapis filamentueux orange vif de 5 à 6 cm, majoritairement sur des substrats détritiques (photos 65 et 66). Les trichomes sont de forme spiralée de $4,52 \pm 0,37$ de large et de $10,1 \pm 0,62$ µm de longueur (prélèvement en juin 2008, L13) (photo 67).



Photos 65, 66 et 67 : Vues macroscopique (65 et 66) et microscopique (67) de *Spirulina weissii* (*200).

Trichodesmium erythraeum (Ehrenberg ex Gomont, 1892), Oscillatorielle pélagique, est rencontrée à deux reprises en saison chaude, en novembre 2008 (L14) et en novembre 2009, (L17) : à la suite d'efflorescences, les populations viennent se concentrer en surface. Dans la zone de pêche d'Hunëtë, les alizés repoussent ces mattes le long de la côte (photo 68). Les trichomes associés en fagots forment des colonies de couleur rougeâtre (photo 69). La population échantillonnée en novembre 2009 est constituée de trichomes de $9,85 \pm 0,69 \mu\text{m}$ de large ($n = 20$) et de cellules de $6,47 \pm 1,74 \mu\text{m}$ de longueur ($n = 30$). L'étude de cette Oscillatorielle fait l'objet d'un chapitre qui lui est entièrement consacré (cf. ch.2.III).



Photos 68 et 69 : Vues macroscopique (68) et microscopique (69) de *Trichodesmium erythraeum* (Barre d'échelle = 50 μm).

L'ensemble des cyanobactéries rencontrées dans la zone d'étude de Hunëtë sont des espèces communes des lagons de l'Océan Pacifique. La particularité de cette zone est le déséquilibre qui existe, causé par le développement massif de chacune d'entre elles (de manière concomitante ou successive). Des études sur l'aspect écologique, biogéochimique ou encore génétique ont été menées pour certaines d'entre elles (Hoffmann, 1999 ; Abed *et al.*, 2003 ; Pringault *et al.*, 2005 ; Camoin and Gautret, 2006 ; Charpy *et al.*, 2007 ; Golubic *et al.*, 2009 ; Rodier and Le Borgne, 2010). Cependant l'aspect toxicologique a rarement été abordé (Sellner, 1997). Les résultats suivants présentent la toxicité des mattes de cyanobactéries dominées par ces espèces. Nous présenterons également la toxicité des bénitiers et des poissons, inféodés aux zones de prolifération de ces mattes cyanobactérienens afin de mettre

en évidence une possible bioaccumulation des toxines cyanobactériennes au sein de la chaîne trophique.

II.3.c Données toxicologiques

II.3.c.1 *Cyanobactéries*

II.3.c.1.a Récoltes et données d'extraction

Douze mattes de cyanobactéries ont été récoltées et les espèces identifiées pour l'analyse toxicologique. L'objectif est d'évaluer le potentiel毒ique qu'elles présentent, associé au type toxinique qu'elles contiennent.

Dans un premier temps, l'extraction de masse liquide-liquide a été effectuée. Une première série d'analyses (test souris, N2A et RBA) est menée sur les extraits hydrosolubles et liposolubles issus de la première extraction (hydrosoluble (1) et liposoluble (1)) et de la seconde extraction méthanolique acide (hydrosoluble (2) et liposoluble (2)). Les caractéristiques d'extraction sont synthétisées dans le tableau 16.

Dans un second temps, 12 extraits liposolubles (1) dont les quantités sont suffisantes, sont purifiés sur Sep-pak® selon le protocole décrit en partie Matériels et Méthodes (M et M) (tableau 17). La purification est appliquée sur 5 mg d'échantillon. Les fractions collectées, F1, F2 et F3, étant en deçà de la limite de la pesée, les valeurs obtenues sont exprimées en mg équivalent d'extrait liposoluble de cyanobactéries (mg eqv d'extrait).

Tableau 16 : Caractéristiques des échantillons de cyanobactéries analysés et masses d'extraits obtenues en extraction méthanolique et extraction méthanolique acide (Mc Elhiney *et al.*, 1998 ; Nicholson and Bruch, 2001 et Laurent *et al.*, 2008) ; ND : Non déterminé ; les masses d'extraits sont exprimées en g et en % par rapport la masse lyophilisée extraite.

Date		Caractéristiques de l'échantillon			Extraction méthanolique		Extraction méthanolique acide	
		Espèces majoritaires	Zone	Masse lyophilisée (g)	Hydrosoluble 1 g (%)	Liposoluble 1 g (%)	Hydrosoluble 2 g (%)	Liposoluble 2 g (%)
2005/11	L3	<i>H. cf. glutinosum</i> <i>O. bonnemaisonii</i> , <i>O. holdeni</i>	4A	6,2	1,23 (19,8)	0,0863 (1,4)	ND	ND
2006/03	L5	<i>O. subuliformis</i> , <i>H. glutinosum</i>	4A	ND	0,11	ND	0,0008	0,0001
2006/05	L6	<i>O. subuliformis</i> , <i>O. cf. bonnemaisonii</i>	5A 6A	ND	0,43	0,1990	0,1050	0,0120
2006/08	L7 N	<i>P. laysanense</i> , <i>H. lyngbyaceum</i>	5C	478	ND	1,6060 (0,4)	2,4260 (0,5)	0,0100 (0,01)
2006/08	L7 O	<i>S. cf. weissii</i>	4B 4C 5B 5C	239	78,70 (32,9)	1,8350 (0,8)	3,2730 (1,4)	0,0430 (0,2)
2007/08	L9	<i>H. lyngbyaceum</i> , <i>Oscillatoria</i> sp. <i>P. laysanense</i>	6A	ND	11,70	0,1330	ND	ND
2008/02	L12	<i>H. glutinosum</i>	4C	20,7	4,22 (20,4)	0,1844 (0,9)	0,2770 (1,3)	0,0033 (0,02)
2008/06	L13	<i>S. weissii</i>	4B 4C 5B 5C	73,9	35,15 (47,6)	0,1441 (0,2)	ND	ND
2008/11	L14	<i>Trichodesmium</i> sp	5A	63,6	33,40 (52,3)	0,6925 (1,1)	1,4537 (2,3)	1,3039 (2,1)
2009/11	L17	<i>O. cf. bonnemaisonii</i>	5B	45,5	37,30 (82,0)	1,2026 (2,6)	ND	ND
		<i>T. erythraeum</i>	5A	67,9	37,60 (55,4)	0,1543 (0,2)	ND	ND
		<i>P. laysanense</i>	5B	ND	12,20	0,4606	ND	ND

Tableau 17 : Liste des extraits liposolubles (1) de cyanobactéries récoltées en ZT purifiés sur Sep-Pak®.

Date	Réf.	Espèces majoritaires	Zone
2005	2005/11	L3	4A
	2006/03	L5	4A
2006	2006/05	L6	5A / 6A
	2006/08	L7N	5C
2007	2006/08	L7O	5B 5C 6B 6C
	2007/02	L9	6A
2008	2008/02	L12	4C
	2008/06	L13	5B 5C 6B 6C
2009	2008/11	L14	5A
	2009/11	L17C01	5B / 5C / 6A
	2009/11	L17C02	5A
2009/11	L17C03	P. laysanense	5B

II.3.c.1.b Données de toxicité

Etudes antérieures

Les échantillons de cyanobactéries récoltées en novembre 2005 et mai 2006 (L3, L6), composés respectivement d'*H. lyngbyaceum* et de diverses *Oscillatoria*, ont été analysés par le laboratoire d'études et de recherches sur la qualité des aliments et les procédés agro-alimentaires (LERQAP) de l'AFFSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments). La recherche de toxines paralysantes (STX et dérivés) dans les échantillons de cyanobactéries collectées dans la ZT a été motivée par le type de symptômes décrits par les personnes intoxiquées : ils sont similaires à ceux causés par la STX et ses analogues (paresthésies buccales, engourdissements des lèvres s'étendant au visage, cf. ch1.I.1.d).

Brièvement, la méthode utilisée (Lawrence *et al.*, 2005) est basée sur une dérivation pré-colonne de STX et de ses dérivés. Chaque extrait est purifié sur cartouche C18 puis sur cartouche COOH afin de séparer les toxines en trois groupes : le groupe de la STX (STX, néo-STX et dc-STX), le groupe des GTXs (GTX-1 à 6, dc-GTX-2 et 3) et le groupe des toxines C. Deux réactions de dérivation (au peroxyde et au périodate) sont nécessaires pour rendre les différentes toxines fluorescentes et permettre leur identification selon les produits de réaction obtenus.

Sur la base de ces observations, il a été conclu à l'**absence de STX** et de ses dérivés dans les 2 échantillons de cyanobactéries analysés.

II.3.c.1.b.(i) Test souris

Le test souris a été utilisé pour évaluer les toxicités potentielles des extraits hydrosolubles (1) et (2) et liposolubles (1) et (2) des cyanobactéries présentes dans la zone de pêche à Lifou de 2005 à 2009. Les résultats sont résumés dans le tableau 18. La toxicité de chaque extrait est caractérisée par la DL₅₀ estimée (mg / g), sa classe de toxicité et les principaux symptômes.

Fractions hydrosolubles

11 mattes de cyanobactéries récoltées à Lifou constituant 16 extraits ont pu être testées. Tous les extraits hydrosolubles (1) et (2) montrent une **toxicité de type paralysant de classe Tox + et Tox ++**. Les DL₅₀ estimées sont, pour la plus毒ique, de 0,75 mg / g (mattes constituées d'*H. lyngbyaceum*, *Oscillatoria* sp. et *P. laysanense* ; L9 (1)) et, pour la moins toxicque, supérieure à 5 mg / g (*O. subuliformis*, *O. cf. bonnemaisonii* ; L6 (1) et *S. weissii* (L7O(2))). La toxicité est exprimée chez la souris par une paralysie progressive touchant l'ensemble du corps jusqu'à son affaissement total. La mort survient plus ou moins rapidement (de 1 mn à 4 h) par détresse respiratoire précédée éventuellement de spasmes ou de réflexes de suffocation. La paralysie générale chez les souris fortement affectées se traduit par une phase de coma ; celle-ci peut-être fatale mais de manière surprenante, certaines souris ont la capacité de récupérer au bout de 9 h. Ainsi par exemple, les souris injectées à 1 mg / g de l'extrait de *T. erythraeum* de novembre 2009 (L17 C2) ont récupéré en 5 h et celles injectées à 2,5 mg / g de *P. laysanense* de novembre 2009 (L17 C3) ont récupéré en 9 h. La récupération progressive de la motricité est toujours totale.

Les extraits MeOH (hydrosoluble 1) et MeOH acide (hydrosolubles 2) d'un même échantillon montrent une toxicité s'accompagnant de symptômes similaires mais certains extraits méthanoliques acides s'avèrent plus toxiques que les extraits méthanoliques (L5, L7N et L12) alors que pour d'autres échantillons, nous notons des résultats inverses (L6 et L7O). Ces éléments suggèrent que l'extraction méthanolique acide permet pour certains lots de cyanobactéries d'extraire *en sus* des toxines de même famille toxinique que celles extraites lors de la phase d'extraction méthanolique initiale (mêmes symptômes). A priori, cette étape d'extraction complémentaire ne permettrait donc pas d'isoler de nouvelles familles toxiniques mais permettrait de parachever l'extraction méthanolique initiale.

Les cyanobactéries collectées à Lifou contiennent donc des **toxines hydrosolubles à activité paralysante**. Les symptômes sont en faveur de la présence de toxines comme l'AnTX-a, l'HAnTX-a ou des toxines de la famille des STXs. Il est difficile de discriminer l'une ou l'autre des toxines paralysantes tant leurs symptômes caractéristiques sont proches. En revanche, nous écartons la possibilité de la présence de l'AnTX-a (s) étant donné qu'aucune souris injectée n'a montré de symptôme d'hypersalivation, caractéristique de cette neurotoxine.

Tableau 18 : Données de toxicité des extraits hydrosolubles (1) et (2) et liposolubles (1) et (2) de cyanobactéries analysés à l'aide du test souris : DL₅₀ estimée en mg d'extrait / g de souris, Classe de toxicité et Symptômes principaux ; ND : Non Déterminé, (1) : extraction méthanolique ; (2) : extraction méthanolique acide.

Date de mission	Espèces majoritaires	Extraits	Fraction hydrosoluble				Fraction liposoluble			
			DL ₅₀ (mg/g)	Classe	Symptômes		DL ₅₀ (mg/g)	Classe	Symptômes	
2006-03	<i>O. subuliformis</i> ; <i>H. glutinosum</i>	L5 (1)	3	Tox+	Paralysie générale		0,5-1	Tox++	Paralysie arrière train, mort au bout de 12hrs	
		L5 (2)	1 - 3	Tox++	Mort par détresse respiratoire		-	-	-	
2006-05	<i>O. subuliformis</i> ; <i>O. cf.</i> <i>bonnemaisonii</i>	L6 (1)	2 - 5	Tox++	Paralysie générale, mort par détresse respiratoire		1,0 - 2,0	Tox++	Symptômes type CTx-like pendant 20hrs, faiblesse, ataxie	
		L6 (2)	> 5,0	Tox+	Contractions		-	-	-	
2006-07	<i>P. laysanense</i>	L7N (1)	2 - 3	Tox ++	Paralysie générale, spasmes, mort par détresse respiratoire, coma		1,0 - 2,0	Tox++	Contraction du train arrière, spasmes, ataxie, suffocation	
		L7N (2)	<2 ,0	Tox ++	Paralysie générale, mort par détresse respiratoire, cyanose des extrémités		1,0 - 2,0	Tox+	Contraction du train arrière, spasmes, ataxie, suffocation	
2006-07	<i>S. weissii</i>	L7O (1)	1,0-2,5	Tox ++	Paralysie générale, spasmes		-	Atox	-	
		L7O (2)	> 5,0	Tox +	Paralysie, diarrhée		-	Atox	-	
2007-02	<i>H. lyngbyaceum</i> ; <i>Oscillatoria</i> sp.; <i>P. laysanense</i>	L9 (1)	0,75 - 1,0	Tox ++	Paralysie générale, coma, mort par détresse respiratoire		ND	Tox+	Affaiblissement, perte de réactivité, tremblement, affaissement	
		L12 (1)	2,5 - 5	Tox ++	Paralysie générale, coma, mort par détresse respiratoire		-	-	-	
2008-02	<i>H. glutinosum</i>	L12 (2)	1,5 - 2,5	Tox ++	Paralysie générale, coma, suffocation, mort par détresse respiratoire		-	-	-	
		L13 (1)	1,0 - 2,5	Tox ++	Paralysie générale, coma, mort par détresse respiratoire		-	-	-	
2008-06	<i>S. weissii</i>	L14 (1)	1,0	Tox ++	Paralysie générale, coma, mort par détresse respiratoire		>2,5	Tox+	Spasmes, Contractions abdominales, Ataxie	
2008-11	<i>T. erythraeum</i>	L17 (1)	2,5 - 3	Tox++	Paralysie générale, coma, mort par détresse respiratoire		ND	ND	Spasmes, Contractions abdominales, Ataxie, Train arrière paralysé, diarrhée, Note : yeux boursoufflés (n = 1)	
		L17 (1)	1,0 - 5,0	Tox ++	Paralysie générale, coma, mort par détresse respiratoire		-	-	-	
2009-11	<i>P. laysanense</i>	L17 (1)	5,0	Tox ++	Paralysie générale, coma, mort par détresse respiratoire		-	-	-	

Fractions liposolubles

7 mattes de cyanobactéries constituant 9 extraits liposolubles (1) et (2) sont testés. Les faibles quantités de matière disponibles pour certains d'entre eux (5) n'ont pas permis leur analyse. En effet, un minimum d'environ 100 mg est requis pour l'analyse d'un échantillon de cyanobactérie afin de s'assurer d'une réponse interprétable (symptômes et dose sublétale).

Les extraits liposolubles de cyanobactéries collectées en mars, mai et août 2006 (L5, L6 et L7N) sont les plus toxiques (Tox++) avec des valeurs de DL_{50} de 0,5 à 2 mg / g. Les extraits liposolubles des mattes de cyanobactéries dominées par *P. laysanense* et *T. erythraeum* sont moyennement toxiques (Tox + et DL_{50} d'environ 2 mg / g). Quant aux extraits liposolubles des mattes de cyanobactéries collectées en août 2006 (L7O), février 2007 (L9), aucun symptôme de toxicité n'est observé (Atox).

Pour les extraits toxiques, les mêmes symptômes majeurs sont observés : paralysie du train arrière, contractions abdominales, faiblesse générale et spasmes pour les souris les plus affectées. Pour quelques souris, des diarrhées sont à noter, notamment celles injectées avec 2,5 mg / g d'extrait de cyanobactéries dominées par *P. laysanense* (L7N (1)) ; mais ce symptôme caractéristique des CTXs n'ayant pu être reproduit lors de l'essai effectué en duplicate, il est donc à considérer avec prudence.

Enfin, soulignons que les effets toxiques perdurent plusieurs heures chez les souris. C'est le cas notamment des souris injectées en concentration sub-létale de l'échantillon dominé par *Oscillatoria spp.* collecté en mai 2006 (L6) qui ne récupèrent qu'au bout de 20 h.

Ainsi, l'observation de ces symptômes et leur durée sont caractéristiques des observations faites chez la souris injectée en i.p. par des CTXs pures exceptée pour le symptôme « diarrhée » (tableau 12). Cette expérimentation démontre la présence, dans les mattes de cyanobactéries de l'ordre des Oscillatoriiales collectées à Lifou, **de composés liposolubles toxiques**. Leur activité serait proche de celles des CTXs mais en l'absence de symptôme typique ne nous ne pouvons conclure quant à leur nature.

La conversion des valeurs de toxicité (en g de cyanobactéries fraîches ou lyophilisées) est difficile vu les fortes variabilités qui peuvent exister entre les prélèvements : les masses de cyanobactéries fraîches et lyophilisées sont très variables en fonction de la quantité d'eau résiduelle. Aussi, nous choisirons de comparer les **DL_{50} exprimées en masse d'extrait** plutôt qu'en équivalent de matière sèche ou fraîche. Ces comparaisons devront tout de même être envisagées avec précautions étant donné les complexes de matière.

II.3.c.1.b.(ii) Test de cytotoxicité sur neuroblastomes

Validation et calibration du test

Avant analyse des extraits au moyen du test N2A, l'optimisation préalable de différents paramètres de ce test (concentration cellulaire optimale et effets du MeOH sur la viabilité

cellulaire) ainsi que sa calibration au moyen d'une toxine standard (PbTx-3, activatrice des CSSP) ont été nécessaires.

Concentration cellulaire.

Afin d'obtenir une sensibilité suffisante pour notre test, le nombre de cellules àensemencer doit être suffisant pour obtenir un signal de détection maximum (absorbance maximum, DO) tout en ayant une réponse linéaire. Nous avons donc vérifié la linéarité de réponse en fonction de la densité cellulaire et sélectionné la densité maximum pour laquelle la réponse linéaire est observée (fiabilité de la réponse). Ainsi, dans nos conditions de culture et de test, la densité cellulaire choisie pour le test de cytotoxicité est de **50 000 cellules par puits** soit $2,5 \times 10^5$ cellules / mL (Volume total par puits = 200 μ L) (figure 32).

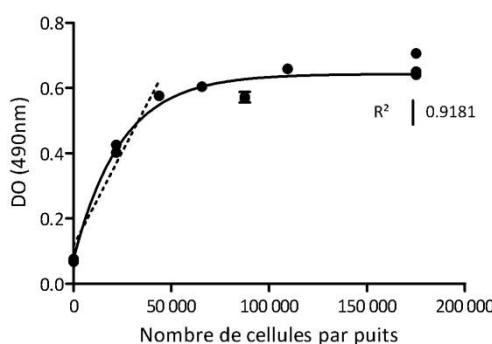


Figure 32 : Absorbance (DO) à 490 nm en fonction du nombre de cellules ensemencées : La DO est proportionnelle au nombre de cellules jusqu'à 50 000 cellules par puits ($R^2 = 0,9181$).

Effet du MeOH.

Le MeOH est utilisé comme solvant pour diluer les extraits testés. Les dilutions successives s'effectuent avec de l'eau pour des raisons d'évaporation. Ainsi, la concentration maximale de MeOH à laquelle seront exposées les cellules est de 5% (V : V). Une gamme de 0 à 8% est testée en conditions -OV et +OV.

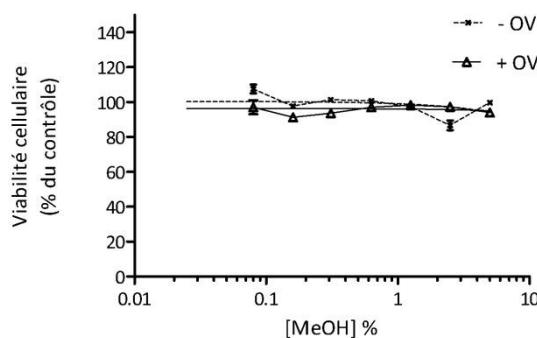


Figure 33 : Effets du méthanol sur la viabilité cellulaire des neuroblastomes.

L'expérience (figure 33), répétée indépendamment trois fois, ne montre pas d'effet toxique du MeOH jusqu'à une concentration de 8% sur les cellules en conditions -OV et +OV (-OV, $p = 0,52$; +OV, $p = 0,45$).

Vérification de la spécificité de la réponse vis à vis de la PbTx-3.

Elle a pour objet de tester l'effet spécifique de toxines agissant sur le site 5 des CSSP et la sensibilité des cellules dans nos conditions de cultures (O : 500 μM ; V : 50 μM et incubation des cellules en présence de toxine 14 h à 37°C). La PbTx-3 connue pour agir spécifiquement sur le site 5 du CSSP à l'instar des CTXs et qui présente l'avantage d'être disponible commercialement (Latoxan, France), a donc été utilisée comme molécule modèle, en substitut des précieuses CTXs. Testée systématiquement en parallèle des extraits à analyser, son utilisation permet de vérifier régulièrement la validité des conditions d'essai et la sensibilité des cultures de neuroblastomes.

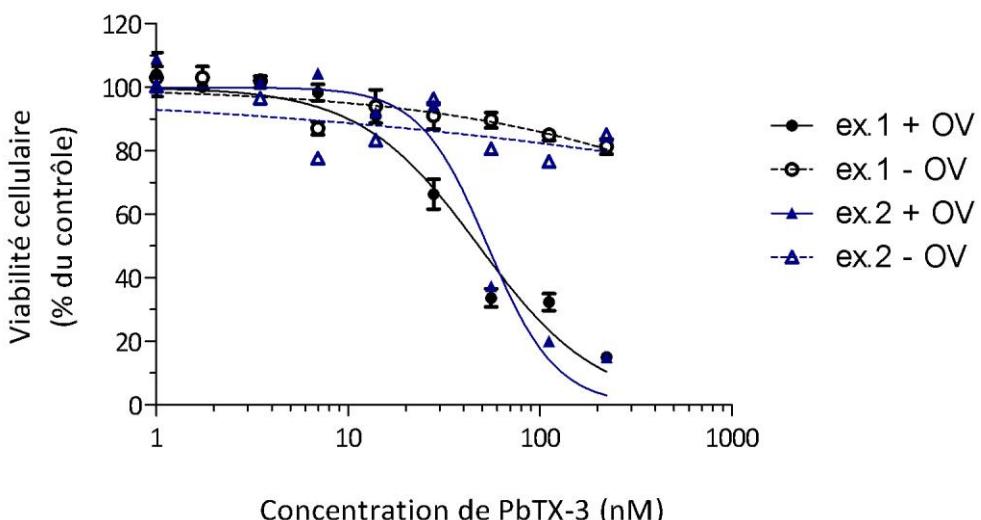


Figure 34 : Effets cytotoxiques de la PbTx-3 en conditions (+OV) et (-OV) ($n = 3$). Présentation de deux essais indépendants (ex.1 et ex.2).

Pour exemple, la figure 34 présente deux essais d'application d'une gamme de PbTx-3 de 0 à 500 nM ($n = 3$). Les cellules ne sont sensibles à l'action de la PbTx-3 qu'en présence des potentialisateurs O et V (conditions +OV) ($p < 0,001$).

Ainsi, dans nos conditions environnementales, la spécificité du test pour l'action de composés agissant sur les CSSP est donc vérifiée et la valeur moyenne des Cl_{50} calculées par GraphPad Prism est de **50,1 ± 8,7 nM** ($n = 12$). Ces valeurs sont comparables à celles recueillies dans la littérature (Dechraoui *et al.*, 1999 ; Bottein-Dechraoui *et al.*, 2005).

Données de cytotoxicité

Analyses par test N2A des extraits liposolubles de cyanobactéries.

Dans un premier temps, les extraits liposolubles (1) de cyanobactéries issus de la séparation liquide - liquide sont testés. La figure 35a représente le type de courbe obtenue après régression sigmoïdale avec le logiciel Graphpad. Ces courbes de régression sigmoïdales sont caractéristiques d'un effet cytotoxique dose-dépendant. Une gamme de concentration de 0 à 625 µg / mL d'extrait est testée pour chaque échantillon -OV et +OV, afin de déterminer le type d'action cytotoxique.

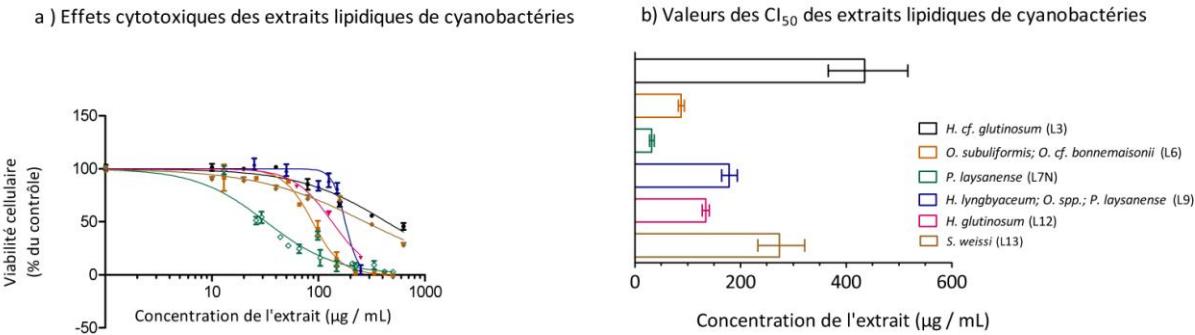


Figure 35 : Evaluation des effets cytotoxiques d'extraits liposolubles de cyanobactéries +OV, (a) courbes de cytotoxicité, (b) valeurs des Cl_{50} en µg / mL.

A partir de ces courbes de régressions sigmoïdales, il est possible de déduire les valeurs d' Cl_{50} propres à chaque extract (figure 35b) ainsi que les valeurs du coefficient de Hill correspondantes (tableau 19).

Tableau 19 : Valeurs des Cl_{50} des extraits liposolubles de cyanobactéries (µg / mL) et coefficients de Hill correspondants.

Espèces majoritaires	Date	Réf.	Cl_{50} µg d'extrait / mL	Coefficient de Hill
<i>H. cf. glutinosum</i>	2005/11	L3	435 ± 75	-1,0 ± 0,2
<i>O. subuliformis, O. cf. bonnemaisonii</i>	2006/05	L6	88 ± 6	-3,0 ± 0,6
<i>P. laysanense</i>	2006/08	L7	27 ± 4	-1,0 ± 0,2
<i>H. lyngbyaceum, Oscillatoria sp., P. laysanense</i>	2007/08	L9	179 ± 15	-1,0 ± 0,5
<i>H. glutinosum</i>	2008/02	L12	134 ± 7	-2,0 ± 0,3
<i>S. weissii</i>	2008/06	L13	274 ± 44	-0,8 ± 0,1

Les valeurs de cytotoxicité -OV et +OV ne sont pas significativement différentes ($p < 0,05$). La cytotoxicité des extraits liposolubles de cyanobactéries analysés n'est donc pas liée à une action spécifique (activatrice ou inhibitrice) sur les CSSP.

Les extraits de mattes de cyanobactéries dominées par *P. laysanense* (L7) et *Oscillatoria* spp. (L6) sont les plus cytotoxiques avec une Cl_{50} de 27 ± 4 et 88 ± 6 µg d'extrait / mL respectivement. Les extraits de mattes de cyanobactéries dominées par *H. lyngbyaceum*, *Oscillatoria* sp., *P. laysanense* (L9) et *H. glutinosum* (L12) manifestent une cytotoxicité de niveau comparable avec une Cl_{50} de 179 ± 15 et 134 ± 7 µg d'extrait / mL.

Le calcul des Cl_{50} n'a pas été possible pour tous les extraits testés. Pour certains essais en effet, les valeurs du coefficient de Hill étaient trop élevées et après analyse des coefficients de (R^2), ils traduisent davantage un effet d'origine matricielle qui s'observe au-delà d'une certaine concentration d'extrait. En pratique, cela se traduit par une viabilité cellulaire passant de 100% à près de 0% sans effet dose (courbe caractérisée par une pente très abrupte).

Ainsi, **dans un deuxième temps**, nous nous sommes orientés vers la purification de ces extraits par chromatographie en phase inverse. Les extraits de cyanobactéries sont purifiés sur sep-pak® selon le protocole déjà présenté en partie M et M et les trois fractions collectées (F1, F2 et F3) sont testées en test N2A afin d'évaluer leur potentiel toxique.

Analyses par test N2A des extraits liposolubles de cyanobactéries purifiés sur Sep-pak®.

La séparation par cartouche de sep-pak® permet de séparer les composés les plus polaires (F1), des composés les moins polaires (F2 puis F3). Les fractions F2 permettent de recueillir les composés dont la polarité (MeOH : H₂O, 90 : 10) est proche de celles des CTXs. Une gamme de concentration de 0 à 625 µg eqv d'extrait / mL est testée. La figure 36 présente des exemples de courbes de cytotoxicité de F1, F2 et F3 pour certains extraits liposolubles (1) de cyanobactéries. L'ensemble des courbes est regroupé en annexe 1.

Ces analyses ont apporté les informations suivantes :

- Aucune des fractions F1 (les plus polaires) n'a montré de toxicité, et ce même à des concentrations atteignant 625 µg eqv d'extrait / mL,
- Les fractions F3 (les moins polaires) n'ont pas révélé de toxicité dans la gamme de concentrations testées, excepté pour les échantillons dominés par *P. laysanense* (L7N) et *S. weissi* (L7O) pour lesquels une diminution dose-dépendante de la viabilité cellulaire est observée (figure 36). Toutefois, aucune valeur de Cl_{50} n'a pu être évaluée.
- Les fractions F2 provoquent une diminution de la viabilité cellulaire selon un effet dose-dépendant de type sigmoïdal. Les valeurs des Cl_{50} calculées sont résumées au tableau 20 et en figure 37.

Spécificité de l'action des substances cytotoxiques.

L'effet cytotoxique des extraits F2 est testé en conditions -OV et +OV, afin de caractériser le type d'action des composés toxiques. Les valeurs des Cl_{50} calculées -OV et +OV ne sont pas significativement différentes pour la majorité des échantillons (8 sur 12 ; p= 0,12 à 0,80). Par contre, les Cl_{50} (-OV) sont significativement inférieures aux Cl_{50} +OV pour 4 extraits

issus des mattes dominées par *T. erythraeum*, *P. laysanense* et *O. bonnemaisonii* collectées en novembre 2009 (L17) et *Oscillatoria* spp. collectées en février 2007 (L9). Une diminution de la toxicité d'un extrait +OV révèlerait une inhibition de la toxicité CSSP-dépendante. Celle-ci pourrait provenir soit d'un blocage de l'entrée massive des ions Na^+ au niveau du CSSP, soit d'une levée du blocage de la sortie des ions Na^+ induite par O ou encore par une combinaison des deux mécanismes.

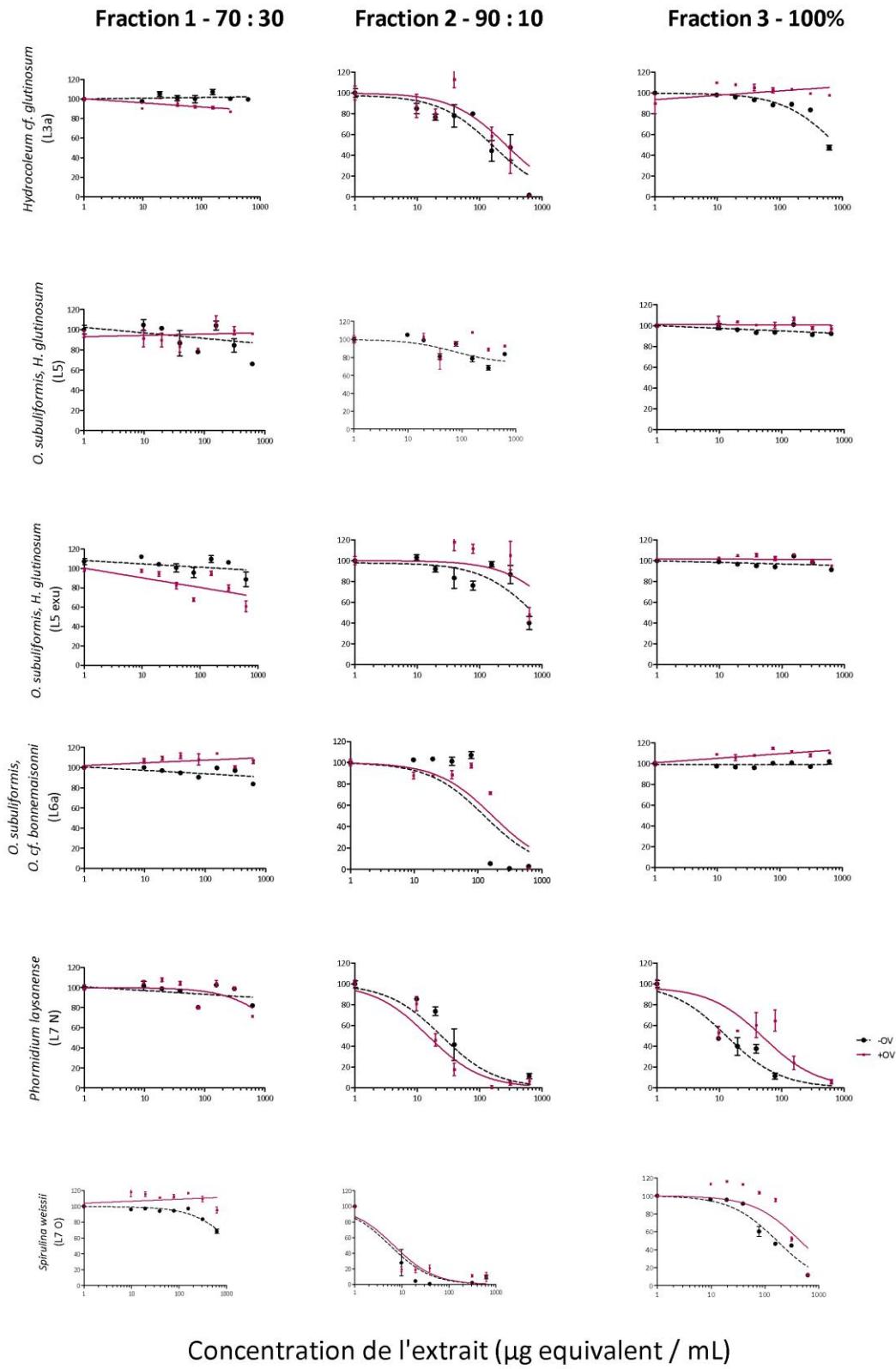


Figure 36 : Effets cytotoxiques des fractions F1, F2, F3 d'extraits liposolubles de cyanobactéries purifiés sur Sep-pak®.

Tableau 20 : Valeurs des Cl₅₀ des fractions F2 des extraits liposolubles de cyanobactéries (µg eqv / mL) ; ND : non déterminé.

Espèces majoritaires	Date	Réf.	-OV		+OV	
			Cl ₅₀ µg eqv d'extrait / mL	Coefficient de Hill	Cl ₅₀ µg eqv d'extrait / mL	Coefficient de Hill
<i>H. cf. glutinosum</i>	2005/11	L3	138 ± 44	-1,1 ± 0,3	197 ± 77	ND
<i>O. subuliformis,</i> <i>H. glutinosum</i>	2006/03	L5	ND	ND	ND	ND
<i>O. subuliformis,</i> <i>O. cf. bonnemaisonii</i>	2006/05	L6	303 ± 37	-3,9 ± 1,3	330 ± 46	ND
<i>P. laysanense</i>	2006/08	L7	7 ± 3	ND	4 ± 3	ND
<i>S. weissii</i>	2006/08	L7	7 ± 2	ND	6 ± 2	-1,7 ± 0,6
<i>H. lyngbyaceum,</i> <i>Oscillatoria sp.,</i> <i>P. laysanense</i>	2007/02	L9	114 ± 25	-0,9 ± 0,2	260 ± 27	-4,0 ± 1,4
<i>H. glutinosum</i>	2008/02	L12	320 ± 40	-2,8 ± 0,9	ND	ND
<i>S. weissii</i>	2008/06	L13	125 ± 37	-1,1 ± 0,3	ND	ND
<i>T. erythraeum</i>	2008/11	L14	72 ± 16	-1,4 ± 0,4	98 ± 12	ND
<i>O. bonnemaisonii</i>	2009/11	L17	142 ± 19	-1,4 ± 0,2	254 ± 28	-4,2 ± 1,5
<i>T. erythraeum</i>	2009/11	L17	43 ± 7	-1,9 ± 0,5	92 ± 19	-2,3 ± 1,0
<i>P. laysanense</i>	2009/11	L17	36 ± 8	-1,2 ± 0,3	97 ± 12	-2,4 ± 0,6

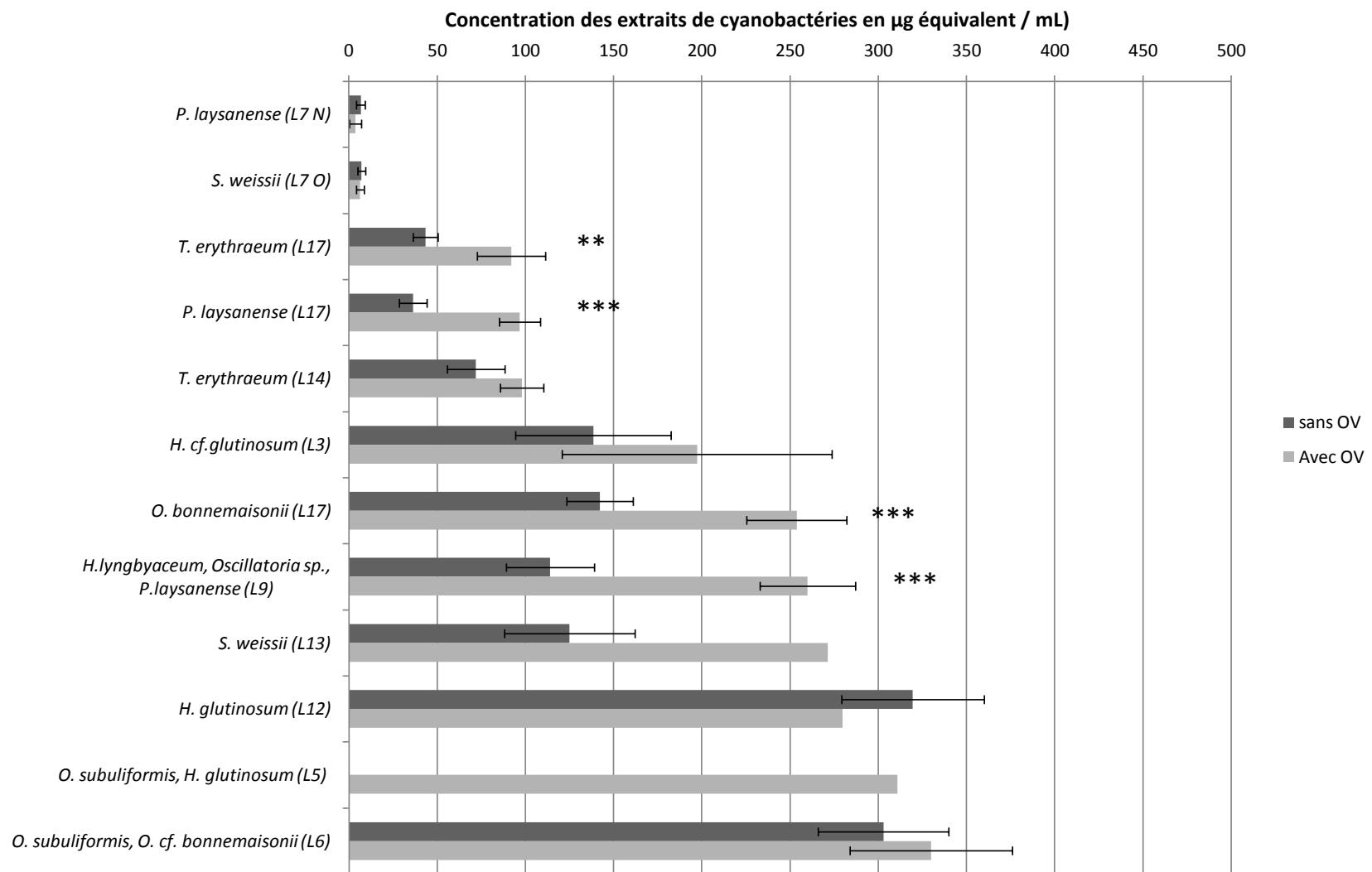


Figure 37 : Valeurs des CI_{50} des fractions F2 des extraits liposolubles des cyanobactéries purifiées sur sep-pak ($\mu\text{g équivalent / mL}$) ;
 ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Les cytotoxicités individuelles.

Toutes les fractions F2 issues de la purification des extraits liposolubles de cyanobactéries sur sep-pak® ont montré une cytotoxicité, spécifique ou non des CSSP. Les extraits peuvent être regroupés en 3 classes de toxicité sur la base de leurs valeurs de Cl₅₀ calculées en conditions +OV :

- Les plus toxiques, ayant des Cl₅₀ de 4 et 6 µg eqv d'extrait / mL, sont les échantillons issus des mattes dominées par *P. laysanense* et *S. weissii* collectées en août 2006 (L7),
- Un 2nd groupe également toxique, ayant une Cl₅₀ autour de 100 µg eqv d'extrait / mL, est composé des échantillons issus des mattes dominées par *T. erythraeum* collectées en novembre 2008 (L14) et novembre 2009 (L17) et par *P. laysanense* collectée en novembre 2009 (L17),
- Un groupe moyennement toxique dont les Cl₅₀ varient de 197 à 260 µg eqv d'extrait / mL, comprend les échantillons issus des mattes dominées par *H. cf. glutinosum* collectées en novembre 2005 (L3), par *O. bonnemaisonii* collectées en novembre 2009 (L17), par le mélange d'Oscillatoriales collectées en février 2007 (L9) et par *S. weissii* collectée en juin 2008 (L13).

Enfin les résultats concernant les trois derniers extraits de cyanobactéries (*H. glutinosum* (L12), *O. subuliformis* et *H. glutinosum* (L5) et *Oscillatoria* spp. (L6)) ne sont pas suffisamment concluants pour permettre d'évaluer formellement leur niveau de toxicité. Cependant, tenant compte des courbes de cytotoxicité obtenues et des coefficients de régression, ils seraient a priori moins toxiques que l'ensemble des autres extraits analysés. Ceci souligne bien l'intérêt dans l'analyse des résultats de toxicité de cumuler les éléments caractérisant la toxicité (résultats bruts, régression sigmoïdale, écarts à la moyenne et coefficient de Hill).

Les cytotoxicités selon les espèces.

Parmi les espèces les plus toxiques, on peut citer *P. laysanense* collecté en août 2006 (L7) et novembre 2009 (L17) et *T. erythraeum* récolté lors de deux missions en saison chaude en novembre 2008 et 2009 (L14 et L17). La spécificité d'une action toxique sur CSSP n'est pas formellement démontrée pour ces espèces puisque la différence des Cl₅₀ en conditions +OV et -OV n'est significative que pour un seul des prélèvements effectué par espèce.

S. weissii est l'espèce majoritairement représentée dans 2 prélèvements effectués en août 2006 (L7) et juin 2008 (L13) : or ces deux extraits ont révélé des niveaux de toxicités relativement différents avec des Cl₅₀ d'environ 7 et 125 µg eqv d'extrait / mL, respectivement. Une explication possible des différences observées réside dans le degré de pureté des échantillons, variable d'un prélèvement à l'autre. D'autres causes possibles incluent : les différences de profil toxinique observables d'une lignée à l'autre y compris au sein d'une même espèce, la production toxinique qui peut être stimulée ou inhibée selon la saison, la phase de croissance ou encore l'influence de certains facteurs environnementaux (lumière, salinité, température, compétition entre espèces...), etc. Les différences

saisonnieres sont d'ailleurs illustrées par les résultats des analyses faites sur *P. laysanense* collectée en saison froide (L7), puis chaude (L17) mais qu'il est difficile de généraliser à l'ensemble des espèces étudiées.

Efficacité de la purification sur sep-pak®.

Sur la majorité des résultats obtenus (exceptés pour deux d'entre eux), la purification sur sep-pak® s'est révélée efficace et adaptée. La fraction F1 qui ne contient a priori aucun composé toxique, présente l'avantage de « nettoyer » et purifier de manière relativement efficace l'extrait liposoluble 1, puisqu'une quantité de matière estimée à environ 30% est extraite dans F1 sans conséquence notable sur la toxicité de l'extrait global. D'autre part, l'ensemble des fractions F2 toxiques montre des effets toxiques dose-dépendant associés à des valeurs de coefficient de Hill n'évoquant pas d'effet matriciel. En outre, les valeurs de Cl_{50} des fractions F2 sont inférieures à celles obtenues pour les mêmes échantillons liposolubles bruts (tableau 21). L'étape de purification sur sep-pak® a donc permis d'augmenter l'effet cytotoxique des extraits. En d'autres termes, elle confère aux extraits F2 une qualité et un niveau de purification particulièrement bien adaptés aux conditions du test N2A.

Tableau 21 : Comparaison des valeurs moyennes, minimum et maximum, des Cl_{50} en conditions +OV des extraits liposolubles (1) de cyanobactéries et des fractions F2 de ces mêmes extraits liposolubles préalablement purifiés sur sep-pak®.

Cl_{50}	Extrait liposoluble (1)			Fractions F2 de l'extrait liposoluble (1)		
	Minimum	Maximum	Moyenne	Minimum	Maximum	Moyenne
mg ou mg eqv d'extrait / L	27	435	190	4	300	149

Enfin, nous avons testé les fractions F3 afin de vérifier l'absence dans ces extraits de cyanobactéries de composés toxiques moins polaires que les CTXs. Cela semble effectivement le cas pour l'ensemble des extraits testés, à l'exception des fractions purifiées F3 de *S. weissii* et *P. laysanense* (L7O et L7N). Deux explications peuvent être avancées : i) étant donné la très forte toxicité des fractions en F2, il se peut que le volume d'élution MeOH : H₂O (90 : 10) utilisé dans nos conditions d'essais (20 mL) ne soit pas suffisant au vu des produits extraits (qualité ou quantité) ou ii) cet échantillon contient effectivement des composés de polarité inférieure. Afin de se soustraire de la 1^{ère} hypothèse, le volume d'élution de la fraction F2 pourra être augmenté de 20 mL à 30 mL.

Pour résumer, les valeurs minimum, maximum et moyenne de Cl_{50} des fractions F2 en conditions +OV, converties respectivement en eqv. PbTx-3 et P-CTX-3C sont données à titre indicatif dans le tableau 22 de manière à faciliter l'analyse comparative avec les autres données de toxicité présentées dans le cadre de cette thèse. Les Cl_{50} sont converties sur la base des valeurs suivantes : i) dans nos conditions de test, la Cl_{50} de la PbTx-3 est de 50,1 ± 8,7 nM et ii) les Cl_{50} de la PbTx-3 et de la P-CTX-3C respectivement 15 nM et 146 pM déterminées pour des mêmes conditions par Dechraoui *et al.* (1999).

Tableau 22 : Valeurs moyennes, minimum (min.) et maximum (max.) des Cl_{50} des fractions F2 des extraits liposolubles de cyanobactéries obtenues par le test N2A (+OV) ; ces valeurs sont converties en eqv de toxines pures selon Dechraoui *et al.*, 1999.

Cl_{50} F2 Cyanobactéries	mg eqv d'extrait / L	μg eqv PbTx-3 / g eqv d'extrait	ng eqv P-CTX-3C / g eqv d'extrait
Moyenne	149	301	3,4
Min – Max.	4 - 300	150 - 11 214	1,7 - 127,1

II.3.c.1.b.(iii) Test RBA

Ce test de fixation spécifique permet de détecter les composés de haute affinité pour le site 5 des CSSP. La toxicité d'un extrait est traduit par sa Cl_{50} exprimée en μg d'extrait / mL ou convertie en μg eqv P-CTX-3C / g d'extrait sur le même principe que pour le test N2A.

Validation du protocole d'extraction au moyen du test RBA.

Dans un premier temps, le test RBA a été utilisé pour valider le protocole d'extraction à appliquer idéalement aux matrices cyanobactériennes. Un échantillon de cyanobactérie composée majoritairement d'*H. lyngbyaceum* récoltée en avril 2005 (L2) a été soumis à trois protocoles d'extraction différents :

- protocole A : déjà décrit dans la partie M et M, qui génère un extrait de type liposoluble (n°1),
- protocole B : décrit par Laurent *et al.* (2008), qui génère respectivement une phase aqueuse (n°2), éthanolique (n°3) et méthanolique (n°4).
- protocole C : décrit dans Laurent *et al.* (2008), qui conduit à 2 phases méthanol aqueuses distinctes (80 : 20 et 60 : 40) (extraits n°5 et 6, respectivement)

Les courbes de compétition RBA correspondant à ces 6 extraits sont présentées en figure 38 et ont permis le calcul des Cl_{50} .

Les résultats obtenus (tableau 23) mettent en évidence une toxicité dans la fraction liposoluble (1) avec une affinité de l'ordre de 2,41 μg eqv P-CTX-3C / g d'extrait. La matte d'*H. lyngbyaceum* est donc toxique et contient des composés ayant une affinité plus importante que la PbTx-3 spécifiquement pour le site 5 des CSSP.

L'analyse des extraits 2, 3 et 4 issus du protocole d'extraction B ne permet pas de conclure quant à une éventuelle toxicité dans ces extraits (*, tableau 23) dont les effets en RBA évoquent davantage un effet matrice.

Le protocole d'extraction C qui correspond à une étape de purification supplémentaire de la fraction liposoluble (1) obtenue au moyen du protocole d'extraction A. génère deux extraits dont la toxicité cumulée (n°5 + n°6) correspond à la toxicité de la fraction précédente (n°1), indiquant que cette étape d'extraction supplémentaire ne présente pas de réel intérêt.

Le protocole d'extraction de type A est donc retenu pour toute la suite des analyses de toxicité des extraits de cyanobactéries par RBA.

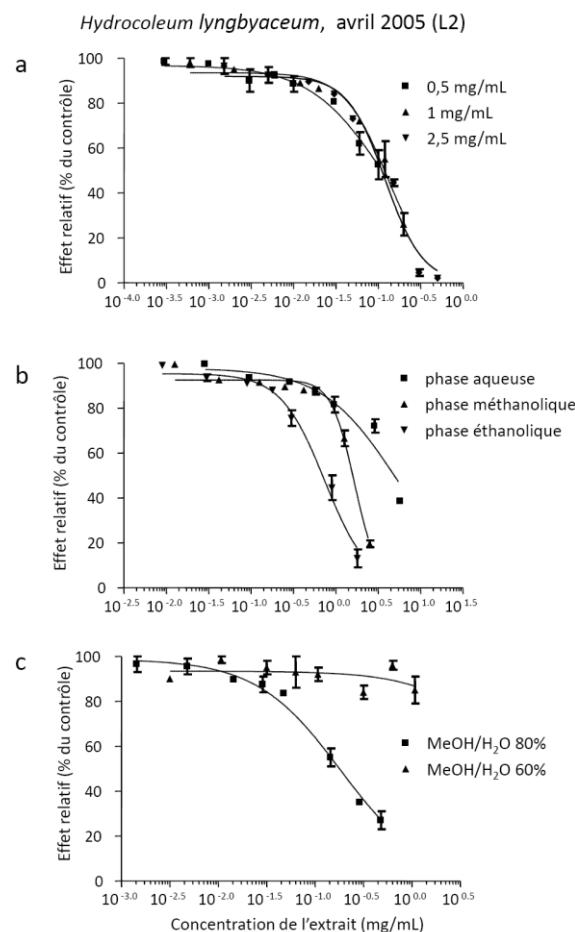


Figure 38 : Courbes de compétition du test RBA des extraits d'*H. lyngbyaceum* (avril 2005, L2) obtenus selon différents protocoles d'extraction : (a) protocole A (extrait n°1), (b) protocole B (extraits n°2, 3 et 4), (c) protocole C (extraits n°5 et 6).

Tableau 23 : Valeurs des Cl_{50} du test RBA pour les extraits d'*H. lyngbyaceum* (L2).

Extraction	N°	Phase d'extraction	Cl_{50} µg / mL	Toxicité équivalente µg eqv P-CTX-3C / g d'extrait	Conclusion
A	1	liposoluble	$257,5 \pm 11,8$	$2,41 \pm 0,11$	Toxique
	2	aqueuse	$7\,998 \pm 1\,601$	$0,08 \pm 0,02$	*
B	3	éthanolique	$2\,421 \pm 963$	$0,28 \pm 0,11$	*
	4	méthanolique	$1\,897 \pm 690$	$0,35 \pm 0,13$	*
C	5	méthanolique 80/20	319 ± 106	$2,06 \pm 0,69$	Toxique
	6	méthanolique 60/40	2120	$0,26 \pm 0,11$	Atoxique

Analyses des extraits liposolubles (1) de cyanobactéries par le test RBA.

Une gamme de 8 concentrations a été testée pour générer les courbes de régression sigmoïdale permettant de calculer les valeurs de Cl_{50} ($\mu\text{g d'extrait / mL}$) correspondantes (figure 39 et tableau 24).

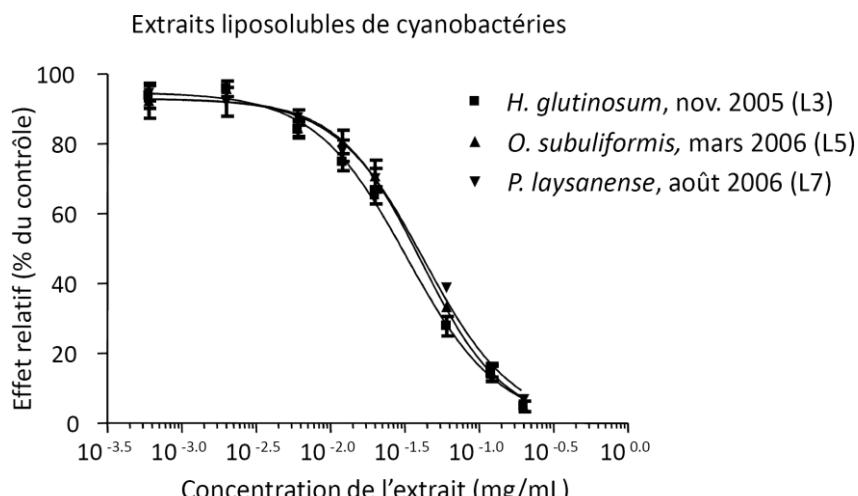


Figure 39 : Courbes de compétition des extraits liposolubles de cyanobactéries récoltées en ZT à Lifou.

Tableau 24 : Valeurs des Cl_{50} du test RBA pour les extraits liposolubles de cyanobactéries récoltées en novembre 2005 (L3), mars et août 2006 (L6 et L7).

Dates	Réf.	Espèces majoritaires	Cl_{50} $\mu\text{g / mL}$	Toxicité équivalente $\mu\text{g eqv. P-CTX-3C / g d'extrait}$
2005/11	L3	<i>H. glutinosum</i>	71 ± 3	$8,87 \pm 0,48$
2006/03	L5	<i>O. subuliformis</i>	86 ± 11	$7,41 \pm 0,92$
2006/08	L7	<i>P. laysanense</i>	75 ± 16	$8,68 \pm 2,09$

Les valeurs de Cl_{50} obtenues sont de l'ordre de 71 à 86 $\mu\text{g d'extrait / mL}$, ce qui témoigne d'une toxicité élevée de ces extraits liée à la présence de composés présentant une forte affinité pour le site 5 du CSSP. Le recours au test RBA a donc permis dans le cas de ces 3 échantillons de cyanobactéries de conclure plus avant sur la nature des toxines impliquées, là où le test N2A avait seulement permis de mettre en évidence un effet cytotoxique, sans autre information sur le mode d'action des composés toxiques. L'intérêt de la complémentarité de ces 2 tests est ainsi illustré.

Analyses par test RBA des extraits liposolubles de cyanobactéries purifiés sur Sep-pak®.

Onze fractions F2 (90 : 10) des extraits liposolubles des mattes de cyanobactéries purifiées sur Sep-Pak® sont analysées par le test RBA. Les valeurs des Cl_{50} ($\mu\text{g eqv d'extrait / mL}$) et de leur toxicité exprimée en $\mu\text{g eqv de P-CTX-3C / g d'extrait}$ sont présentées dans le tableau 25.

Tableau 25 : Valeurs des Cl_{50} du test RBA pour les fractions F2 purifiés sur Sep-pak® des extraits liposolubles de cyanobactéries récoltées de novembre 2005 à novembre 2009 (L3, L6, L7, L9, 12, L13, L14 et L17).

Date	Réf.	Espèces majoritaires	Cl_{50} µg eqv / mL	Toxicité équivalente µg éqv P-CTX- 3C/g
2005/11	L3	<i>H. cf. glutinosum</i>	275,4	2,25
2006/05	L6	<i>O. subuliformis</i> , <i>O. cf. bonnemaisonii</i>	1108,6	0,56
2006/08	L7	<i>P. laysanense</i>	367,8	1,69
2006/08	L7	<i>S. weissii</i>	545,6	1,14
2007/02	L9	<i>H. lyngbyaceum</i> , <i>Oscillatoria</i> sp., <i>P. laysanense</i>	218,6	2,84
2008/02	L12	<i>H. glutinosum</i>	-	< 0,31
2008/06	L13	<i>S. weissii</i>	723,6	0,86
2008/11	L14	<i>T. erythraeum</i>	122,4	5,07
2009/11	L17C1	<i>O. bonnemaisonii</i>	604,4	1,03
2009/11	L17C2	<i>T. erythraeum</i>	376,4	1,65
2009/11	L17C3	<i>P. laysanense</i>	566,2	1,10

L'analyse en tests RBA a montré la présence de composés ayant une affinité spécifique du site 5 des CSSP pour 10 fractions. Les valeurs de Cl_{50} obtenues sont de l'ordre de 122,4 à 1 108,6 µg eqv / mL.

Les résultats concernant l'extrait purifié de mattes dominées par *H. glutinosum* (L12) ne mettent pas en évidence la présence de tels composés (toxicité < 0,31 ng eqv de P-CTX-3C).

Les résultats en N2A et en RBA indiquent que les mattes dominées par les cyanobactéries collectées en ZT contiennent à la fois :

i) des composés liposolubles agissant spécifiquement sur le site 5 des CSSP (test RBA +) et dont la polarité est inférieure à celle des CTXs et

ii) des composés liposolubles cytotoxiques de polarité similaire à celle des CTXs mais dont l'action n'est pas spécifiques des CSSP.

II.3.c.2 Bénitiers

II.3.c.2.a Récoltes et données d'extraction

Des bénitiers ayant provoqué les intoxications à Lifou, ont été récoltés en 2005 et 2006 dans la ZT. Les spécimens ($n = 2$ à 3) ont été rassemblés par date de collecte afin de constituer des « pools » de biomasse suffisante pour l'évaluation du type de toxicité (tableau 26). Des bénitiers « témoin » ($n = 3$) ont également été collectés à l'extérieur de la barrière récifale à l'ouest de la Grande Terre dans une zone réputée indemne de ciguatéra. Les tests

furent effectués en parallèle sur les extraits de bénitiers collectés dans la zone de pêche de Lifou (ZT et ZNT) afin d'évaluer l'effet de la matrice sur les réponses aux différents tests de toxicité (souris, N2A et RBA).

Cette première série d'analyse a ainsi permis i) de déterminer le type de toxicité présente dans ces échantillons de bénitiers et ii) d'affiner le protocole expérimental le mieux adapté à ce type de matrice (modes d'extraction et fractions d'intérêt, en fonction des tests utilisés).

Tableau 26 : Caractéristiques des lots de bénitiers récoltés à Lifou de 2005 à 2006 et bénitiers « témoins », masses d'extraits obtenues en extraction méthanolique et extraction méthanolique acide (Mc Elhiney *et al.*, 1998 ; Nicholson and Bruch, 2001 et Laurent *et al.*, 2008) ; MF : masse des lots de bénitiers frais.

Date	Code	Zone	Caractéristiques		Extraction méthanolique		Extraction méthanolique acide	
			Masse fraîche (g)	Masse lyophilisée (g)	Hydro (1) g (%MF)	Lipo (1) g (%MF)	Hydro (2) g (%MF)	Lipo (2) g (%MF)
2005/04	L2	Toxique	-	-	0,356	0,015	-	-
2005/11	L3	Non toxique	257,6	-	0,247 (1,96)	1,609 (0,6)	-	-
2005/11	L3	Toxique	483,0	215,3	30,556 (0,7)	0,933 (0,2)	2,139 (0,04)	0,932 (0,02)
2006/03	L5	Toxique	326,0	-	10,028 (3,0)	0,277 (0,01)	-	-
2007/02	L9	Toxique	973,9	-	31,307 (3,0)	0,157 (<0,01)	1,437	0,890 (<0,01)
2006/04	Témoin A	Grande Terre	195,2	76,8	9,4 ₅₀ (4,8)	0,255 (0,01)	-	0,016 (<0,01)
2008/08	Témoin B	Grande Terre	639,7	116,2	31,6 (4,9)	0,185 (<0,01)	-	0,082 (<0,01)

A partir de 2008, un second échantillonnage a permis de collecter des individus de bénitiers dans les ZT et ZNT de Hunëtë. La méthodologie d'extraction étant établie, notre objectif était alors d'évaluer la toxicité inter-zone et dans le temps. Le tableau 27 liste l'ensemble des bénitiers collectés en 2008 (L12) et 2009 (L15) ainsi que les données d'extraction caractérisant chacun de ces lots.

Tableau 27 : Bénitiers récoltés en 2008 et 2009, caractéristiques : masses d'extraits obtenues à l'issue des extractions méthanoliques et des extractions méthanoliques acides (Mc Elhiney *et al.*, 1998 ; Nicholson and Bruch, 2001 et Laurent *et al.*, 2008) ; ND : non disponible ; MF et ML : masse des lots de bénitiers frais et lyophilisés respectivement.

	Code	Espèce	Taille (cm)	Extraction méthanolique								Extraction méthanolique acide									
				Massee fraîche			Massee lyophilisée			Hydrosoluble (1)			Liposoluble (1)			Hydrosoluble (2)			Liposoluble (2)		
				(g)	%MF	g	%MF	%ML	g	%MF	%ML	g	%MF	%ML	g	%MF	%ML	g	%MF	%ML	g
2008 - L12	B1	<i>T. maxima</i>	21,5	172,3	22,3	38,5	3,99	17,86	6,8755	0,04	0,18	0,0691	0,16	0,74	0,2837	0,0	0,1	0,0321			
	B2	<i>T. maxima</i>	20,1	197,4	49,2	97,1	2,18	4,42	4,2946	0,07	0,15	0,1465	0,41	0,83	0,8052	0,0	0,0	0,0371			
	B3	<i>T. maxima</i>	17,2	186,7	22,8	42,5	3,14	13,79	5,8628	0,18	0,80	0,3396	0,50	2,21	0,9389	0,0	0,1	0,0635			
	B4	<i>T. maxima</i>	17,0	160,7	21,6	34,7	5,56	25,73	8,9273	0,12	0,56	0,1954	0,28	1,32	0,4577	0,0	0,2	0,065			
	B5	<i>T. maxima</i>	17,0	80,8	21,3	17,2	4,00	18,80	3,2332	0,16	0,76	0,1301	1,40	6,60	1,1346	0,1	0,5	0,0837			
	B6	<i>T. maxima</i>	21,0	104,4	22,8	23,8	4,65	20,39	4,8523	0,15	0,64	0,1517	0,32	1,42	0,3376	0,0	0,1	0,0216			
	B7	<i>T. maxima</i>	21,1																		
	B8	<i>T. maxima</i>	12,5	356,4	20,0	71,2	ND	ND	ND	0,10	0,50	0,3542	ND	ND	ND	0,0	0,1	0,1057			
	B9	<i>T. squamosa</i>	24,3																		
2009 - L15	B1	<i>T. maxima</i>	ND	112,0	25,4	28,5	4,21	16,53	4,7106	0,08	0,30	0,0855	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B2	<i>T. maxima</i>	22,4	142,5	20,7	29,5	4,89	23,61	6,9663	0,10	0,50	0,1465	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B3	<i>T. maxima</i>	23,5	82,1	19,1	15,7	6,98	36,51	5,7327	0,10	0,50	0,0787	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B4	<i>T. maxima</i>	20,2	156,8	18,2	28,5	4,79	26,33	7,504	0,07	0,36	0,1028	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B5	<i>T. maxima</i>	17,5	131,5	18,5	24,3	2,73	14,76	3,5863	0,09	0,49	0,1201	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B6	<i>T. maxima</i>	18,6	396,0	18,6	73,8	3,20	17,18	12,6781	0,15	0,78	0,5771	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B7	<i>T. maxima</i>	17,2	32,5	24,0	7,8	2,59	10,80	0,8423	0,17	0,69	0,0541	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B8	<i>T. maxima</i>	15,4	34,4	20,9	7,2	3,37	16,12	1,1608	0,22	1,04	0,0752	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B9	<i>T. maxima</i>	17,6	8,6	22,1	1,9	4,83	21,87	0,4155	0,40	1,81	0,0344	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B10	<i>T. maxima</i>	18,7	19,0	30,5	5,8	5,18	16,97	0,9843	0,21	0,68	0,0395	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B11	<i>T. maxima</i>	19,4	27,7	19,1	5,3	3,35	17,53	0,9293	0,21	1,11	0,0587	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B12	<i>T. maxima</i>	19,3	19,7	19,3	3,8	4,63	24,02	0,9128	0,18	0,94	0,0358	-	-	-	-	-	-	-	-	-

II.3.c.2.b Purification

Le lot de bénitiers collectés en ZT en novembre 2005 (L3) a permis d'aller plus en avant dans les investigations en appliquant le protocole de purification selon Hamilton *et al.* (2002) présenté en section M et M. L'extrait liposoluble 1 (ici nommé E1) est fractionné sur colonne de Florisil® (E1Fx) puis sur colonne de Sephadex LH20 (E2Fx). Le bénitier « témoin » récolté à l'ouest de la Grande Terre en avril 2006 (« témoin A ») est également fractionné sur colonne de Florisil® mais sa purification sur colonne Sephadex LH20 n'a pu être menée par manque de matière.

Les colonnes de chromatographie sont mises en place manuellement, les paramètres de la purification sont donnés dans le tableau 22.

Tableau 28 : Données des purifications sur colonne de Florisil® et de Sephadex LH20 des bénitiers pêchés à Lifou dans la ZT en novembre 2005 (L3) et du bénitier « témoin » récolté en 2006.

Extrait liposoluble (1)		Dépôt		Colonne			
		Référence	Masse (mg)	Matrice	Longueur (cm)	Diamètre (cm)	Volume d'élution (mL)
2005 / 11	Lot de bénitiers ZT (L3)	E1	933	Florisil®	23,5	1,7	53,0
		E1F5 + E1F6	108	Sephadex LH20	17,0	1,2	8,0
2006 / 04	Bénitier « témoin » A	E1	255	Florisil®	18,0	1,2	20,3

Le tableau 29 donne le détail des masses des fractions E1F1 à E1F9 issues du fractionnement sur colonne de Florisil® de l'extrait liposoluble (1) du bénitier « témoin » A . La figure 40 synthétise les données de purification de l'extrait liposoluble (1) du lot de bénitiers récoltés en ZT

Tableau 29 : Masses (mg) des fractions purifiées de l'extrait liposoluble du bénitier « Témoin » (2006), collectées après purification sur colonne de Florisil® (Hamilton *et al.*, 2002).

Bénitiers « témoin » A	E1	E1F1	E1F2	E1F3	E1F4	E1F5	E1F6	E1F7	E1F8	E1F9
Masses des fractions (mg)	255	91,7	19,3	6,3	3,5	1,5	9,9	2,5	36	86,7

Les fractions susceptibles de contenir les composés d'intérêt sont analysées à l'aide des tests N2A et RBA (rouge, figure 40).

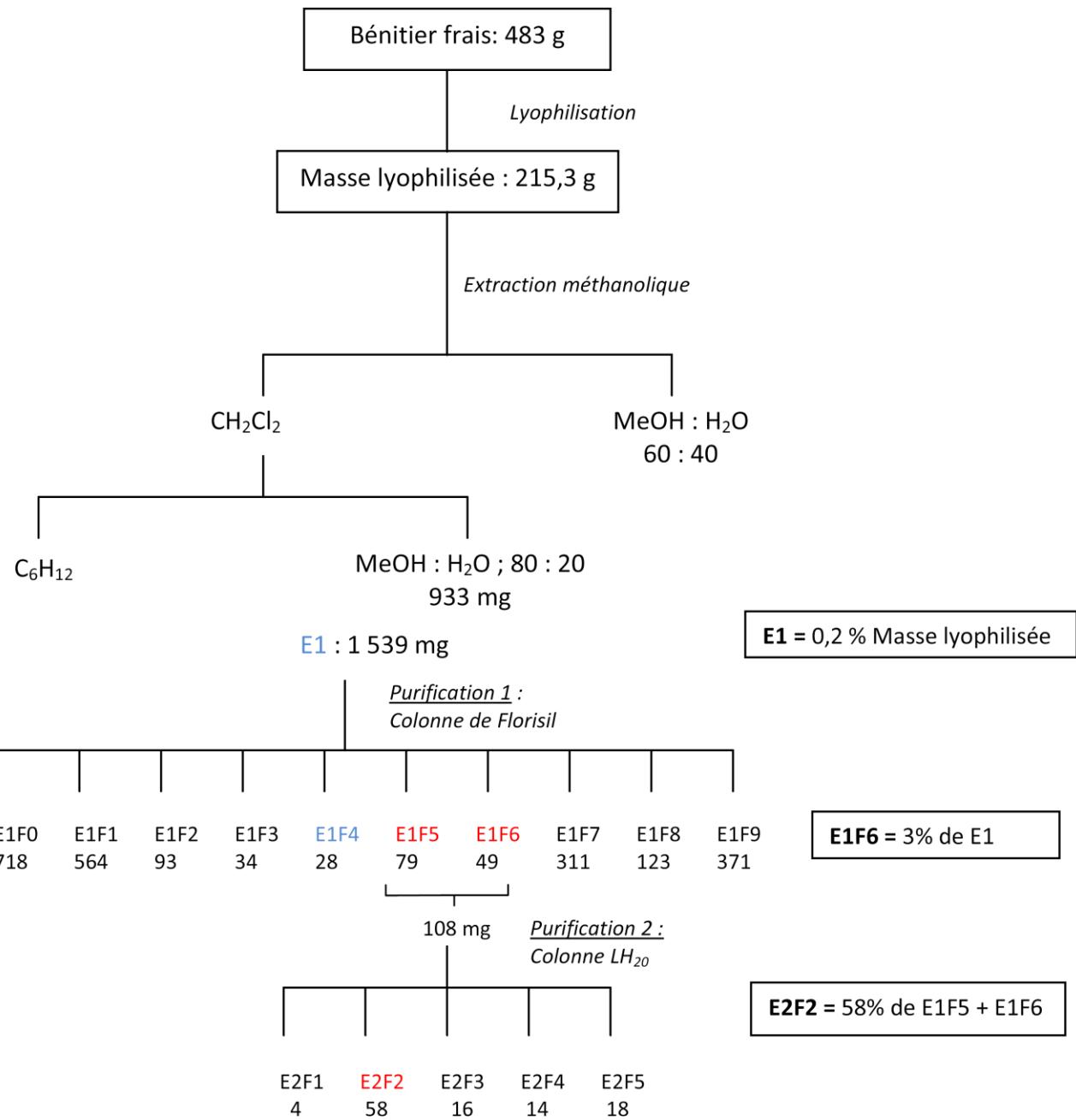


Figure 40 : Données d'extraction et des deux purifications (Hamilton *et al.*, 2002) effectuées sur le lots de bénitiers récoltés en novembre 2005 (L3) dans la ZT de Hunëtë.

II.3.c.2.c Données de toxicité

II.3.c.2.c.(i) Etudes antérieures

Détection d'activités neurophysiologiques.

Des analyses préliminaires en électrophysiologie (test sur les jonctions neuromusculaires) menées au laboratoire de Gif-sur-Yvette ont mis en évidence dans les extraits liposolubles de bénitier des composés dont l'activité est similaire à celle des CTXs (augmentation des MEPPs (miniature end plaque potential), dépolarisation de membranes). Quant à l'extrait hydrosoluble testé sur l'hémodiaphragme de souris au même laboratoire, les résultats sont en faveur de la présence de substances similaire aux STXs (toxines paralysantes ou PST).

Détection des STXs.

La recherche de toxines paralysantes (STX et analogues) dans les bénitiers collectés dans la ZT a été réalisée par le LERQAP de l'AFSSA selon la méthodologie décrite précédemment (ch.2 II.3.c.1.b). L'extrait hydrosoluble (1) des bénitiers collectés en novembre 2003 (L3) est extrait en hydrolyse acide. De faibles teneurs de STX ont été détectées à raison de 112 ng / g d'extrait (soit 7,1 ng / g de matière fraîche). Aucun autre analogue analysé par cette méthode n'a été détecté.

Si l'on considère leurs faibles teneurs en STX, les bénitiers (L3) ne constituent pas de risque pour la santé humaine puisque le seuil sanitaire en vigueur en France pour les coquillages est de 80 µg / g de chair (Frémy et Lassus, 2001). La toxicité des bénitiers ayant causée les intoxications dans la tribu d'Hunëtë serait donc liée à d'autres composés toxiques.

L'ensemble de ces résultats (analyses neurophysiologiques et chromatographiques) bien qu'obtenus sur des lots distincts de bénitiers issus de la même ZT à Lifou, confirment donc la présence chez ces bénitiers d'un complexe toxinique que nous nous proposons de caractériser plus avant.

II.3.c.2.c.(ii) Test souris

Le test souris a été utilisé pour évaluer les toxicités des extraits hydrosolubles (1) et (2) et liposolubles (1) et (2) de bénitiers collectés dans la ZT de Lifou de 2005 à 2009 et des bénitiers considérés comme témoin (de 2006 et 2008). Les résultats sont résumés dans le tableau 30. La toxicité de chaque extrait est caractérisée par sa DL₅₀ estimée (mg d'extrait / g de souris), sa classe de toxicité et les principaux symptômes observés. Les données concernant les bénitiers récoltés lors des missions de 2008 et 2009 (L12, L15) regroupent les observations faites pour les bénitiers testés individuellement. Les quantités disponibles de certains extraits liposolubles (L12, L15 et Témoin A et B) ne sont pas suffisantes pour mener l'analyse.

Tableau 30 : Données de toxicité des extraits hydrosolubles (1) et (2) et liposolubles (1) et (2) de bénitiers analysés à l'aide du test souris : DL₅₀ estimée en mg d'extrait / g de souris, Classe de toxicité et principaux symptômes observés (ND : Non déterminée).

Date	Extraits	Fraction hydrosoluble			Fraction liposoluble		
		DL ₅₀ (mg / g)	Classe	Symptômes	DL ₅₀ (mg / g)	Classe	Symptômes
2005-03	L2	5 - 10	Tox +	Paralysie générale, mort par détresse respiratoire	ND	ND	ND
2005-11	L3	5 - 10	Tox ++	Paralysie générale, mort par détresse respiratoire	0,5 - 1,0	Tox ++	Affaiblissement, perte de réactivité, diarrhée, tremblement, affaissement
2006-03	L5	2 - 5	Tox ++	Paralysie générale, spasmes, mort par détresse respiratoire	1 - 2	Tox ++	Contractions abdominales, spasmes
2007-02	L9 (1) (extraction méthanolique)	5,0 - 7,5	Tox ++	Paralysie générale, spasmes, mort par détresse respiratoire	< 1	Tox ++	Contractions abdominales, paralysie du train arrière
	L9 (2) (extraction méthanolique acide)	5	Tox ++	Paralysie générale, spasmes, mort par détresse respiratoire	> 3	Tox +	Contractions abdominales, paralysie du train arrière
2008-02	L12	5,0 - 7,5	Tox ++	Paralysie générale, spasmes, mort par détresse respiratoire	-	-	-
2009-02	L15	4 - 5	Tox++	Paralysie générale, mort par détresse respiratoire	-	-	-
2006	Témoin A (1) (extraction méthanolique)	-	Atox	-	-	-	-
	Témoin A (2) (extraction méthanolique acide)	-	Atox	-	-	-	-
2008	Témoin B (1) (extraction méthanolique)	< 7,5	Tox	Diarrhée, faiblesse, récupération rapide en 3 h	-	-	-
	Témoin B (2) (extraction méthanolique acide)	< 2,5	Tox++	Paralysie générale, mort par détresse respiratoire	-	-	-

Les fractions hydrosolubles

Tous les extraits hydrosolubles de bénitiers collectés à Lifou et testés sur souris ont révélé des toxicités classées Tox + (L2) ou Tox ++ (L3, L5, L9, L12 et L15), avec des DL₅₀ moyennes de 4 à 5 mg d'extrait / g de souris. Les bénitiers collectés dans la ZT en mars 2006 (L5) sont les plus toxiques : DL₅₀ estimée à 2 à 5 mg /g (soit environ 65 à 160 mg eqv de chair / g de souris). Les symptômes sont de type paralysant, avec une phase de coma possible et la mort par détresse respiratoire. La paralysie, progressive, touche d'abord les membres postérieurs puis antérieurs et enfin l'ensemble du corps. Les récupérations peuvent être rapides : par exemple, l'injection de 4 mg / g d'extrait hydrosoluble provoque chez les souris une paralysie générale proche du coma suivie par une récupération après une phase de transition de 20 min. Certaines souris injectées peuvent parfois mettre plusieurs heures avant de récupérer l'ensemble de leur motricité.

Le test n'a pas mis en évidence de différences de toxicité entre les bénitiers collectés en ZT et ceux collectés en ZNT.

Par contre, les bénitiers « témoin » ont montré des résultats différents : le bénitier de 2006 est atoxique aux concentrations testées, alors que le bénitier de 2008 a fortement affecté les souris qui ont exhibé des symptômes similaires à ceux induits par les autres extraits de bénitiers provenant de Lifou. Le bénitier de 2008 ne peut donc être considéré comme témoin. Cela indique qu'il faut être prudent dans le choix des organismes à considérer comme témoin et qu'une zone initialement réputée indemne peut changer de statut toxique au fil du temps.

Les fractions liposolubles

Seules 4 fractions liposolubles ont pu être analysées. Elles montrent une forte toxicité (Tox ++), avec des valeurs de DL₅₀ de l'ordre de 0,5 à 1 mg / g (soit environ 15 à 65 mg eqv de chair / g de souris).

Les symptômes majoritaires sont une grande faiblesse générale accompagnée de la paralysie du train arrière et de contractions abdominales. La mort survient soit très rapidement dans les 15 premières minutes lorsque des doses supérieures à 5 mg / g sont injectées, ou alors les souris mettent plusieurs heures à agoniser lorsque des doses sublétale leur sont administrées. Ces symptômes rappellent ceux induits par l'injection de CTXs pures notamment la CTX-4, à la différence que les diarrhées profuses ne sont pas observées.

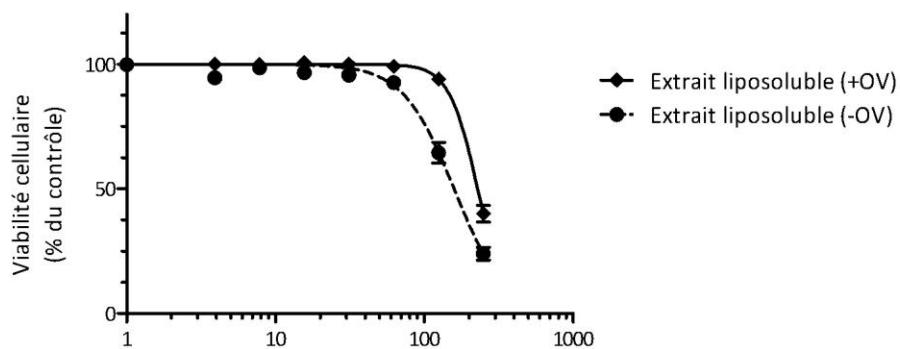
Enfin, afin d'évaluer l'efficacité de l'étape de délipidation, nous avons injecté les fractions cyclohéxaniques des bénitiers collectés en ZT et en ZNT à Lifou en novembre 2005 (L3). Testés à 2 et 5 mg / g, l'injection n'a eu aucun effet sur le comportement des souris. L'étape de délipidation des extraits liposolubles de bénitiers permet donc bien de « nettoyer » la fraction liposoluble sans lui enlever de composés toxiques.

II.3.c.2.c.(iii) Test N2A

Toxicité des lots de bénitiers

Dans un premier temps, nous avons analysé les extraits liposolubles (1) issus des lots de bénitiers collectés en 2005, 2006 et 2008 à Lifou et les bénitiers « témoin » provenant de la Grande Terre. La figure 41 illustre le type de courbes obtenues pour l'analyse des extraits liposolubles des bénitiers en conditions +OV et -OV, et le tableau 31, les valeurs de CI_{50} , coefficients de Hill et coefficient de régression R^2 correspondants.

Bénitier témoin (2008)



Bénitier, février 2007 (L9)

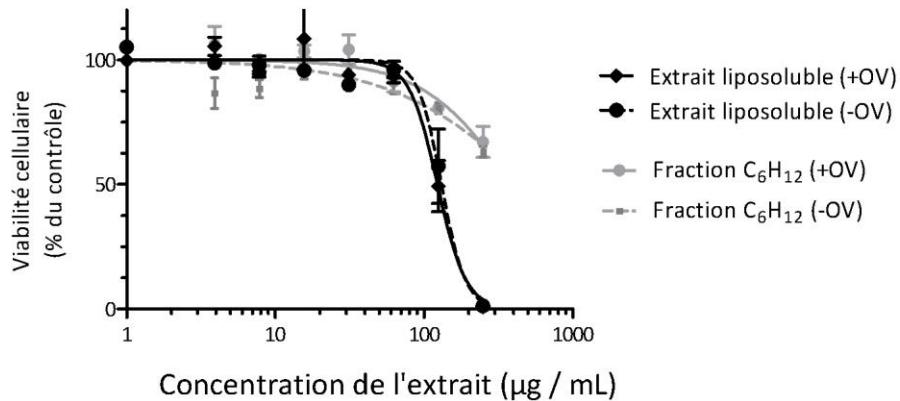


Figure 41 : Effets cytotoxiques des extraits liposolubles des lots de bénitiers « témoin » B (2008) et collectés à Lifou en ZT en février 2007 (L9).

Tableau 31 : Valeurs des Cl_{50} (en $\mu\text{g d'extrait / mL}$ et g de chair fraîche / mL) des extraits liposolubles et cyclohexaniques du lot de bénitiers « témoin » B (08/2008) et du lot de bénitiers de la ZT pêchés en février 2007, L9, en conditions -OV et +OV.

	Extrait		Cl_{50} $\mu\text{g d'extrait / mL.}$	Cl_{50} g eqv de chair / mL.	Coefficient de Hill	R^2
Témoin B 2008	liposoluble	+OV	229 ± 8	4,6 ± 0,2	-4,5 ± 0,9	0,9573
		-OV	159 ± 9	3,2 ± 0,2	-2,5 ± 0,3	0,9611
L9 2007	lipidique	+OV	123 ± 13	3,8 ± 0,4	-4,6 ± 3,0	0,8609
		-OV	132 ± 12	4,1 ± 0,4	-5,5 ± 5,0	0,8523
	cyclohexanique (C ₆ H ₁₂)	+OV	ND	ND	ND	0,6072
		-OV	ND	ND	ND	0,5479

Ces résultats indiquent que :

- Le bénitier collecté en 2008 sur la Grande Terre en tant que « témoin » est en réalité toxique ($Cl_{50} \approx 3,9$ g eqv de chair / mL) avec une activité non spécifique des CSSP.
- Les bénitiers collectés à Lifou en février 2007 (L9) sont plus toxiques avec une activité non spécifique des CSSP ($p = 0,717$).
- La fraction de délipidation (C₆H₁₂) ne contient pas de composés cytotoxiques.

Lots de bénitiers « témoin »

Le bénitier B (2008) « témoin » est toxique : le test N2A montre qu'il contient des composés liposolubles cytotoxiques et le test souris a mis en évidence la présence de substances à activité paralysante (tableau 30). A contrario, le bénitier collecté en 2006 (« témoin A ») s'est révélé atoxique en test souris (tableau 30) et en test N2A. Ce dernier atoxique dans les gammes de concentrations testées est donc utilisé comme « témoin » dans l'étude du fractionnement.

Evaluation de l'applicabilité de l'extraction rapide pour les bénitiers.

Le protocole d'extraction liquide-liquide appliqué aux bénitiers s'avère relativement fastidieux. Aussi compte tenu de la polarité des substances toxiques liposolubles proches des CTXs évaluée précédemment, nous avons voulu tester l'applicabilité de l'extraction rapide pour la matrice bénitiers.

Cette évaluation est menée sur les bénitiers récoltés à Lifou en février 2008 (L12) : 6 spécimens récoltés en ZT (B1 à B6) et 3 spécimens récoltés en ZNT et regroupés en un lot (B7 à B9). Des aliquotes de 5g de chair par spécimen sont broyés et extraites selon le protocole

d'extraction rapide utilisé pour la matrice chair de poissons. Les effets cytotoxiques de la fraction F2 (MeOH : H₂O, 90 : 10) et des extraits liposolubles issus du partage liquide – liquide sont comparés (figure 42). Les valeurs des Cl₅₀, calculées à partir de 3 expérimentations indépendantes ($n = 3$), ont été converties en mg équivalent de chair de bénitier (lyophilisée et fraîche) afin de pouvoir comparer les résultats entre eux.

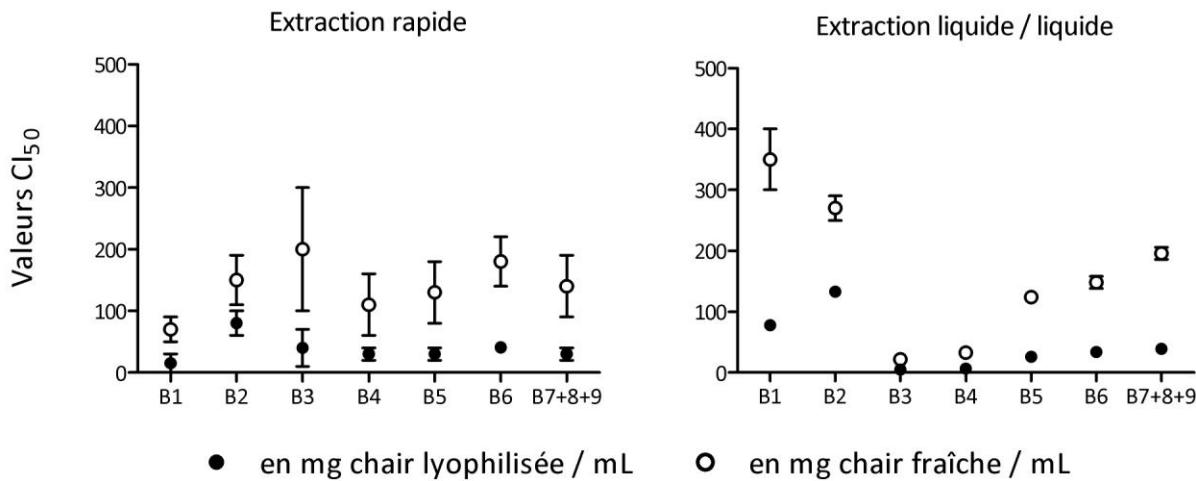


Figure 42 : Valeurs des Cl₅₀ (en mg eqv de chair lyophilisée ou fraîche) des extraits de bénitiers récoltés en février 2008, issus de l'extraction rapide (F2) ou de l'extraction liquide / liquide (extrait liposoluble 1).

On note une différence entre les valeurs de Cl₅₀ (en mg de chair fraîche / mL) obtenues selon les deux techniques d'extraction ($p = 0,025$) et les écarts à la moyenne sont plus importants avec la technique d'extraction rapide. Ces résultats suggèrent que le protocole d'extraction rapide pourtant bien adaptée à la matrice poisson, n'est en revanche pas applicable à celle beaucoup plus complexe et riche en lipides des bénitiers vraisemblablement à l'origine d'une saturation très rapide de la cartouche Sep-pak®. Dans la suite de cette étude, le protocole de partage liquide-liquide sera donc systématiquement privilégié pour évaluer le potentiel毒ique des bénitiers collectés dans la zone d'étude de d'Hunëtë.

Evaluation de la toxicité individuelle des bénitiers collectés en 2008 et 2009 (L12 et L15)

La figure 43 représente les valeurs des Cl₅₀ individuelles des extraits liposolubles de bénitiers récoltés dans les ZT et ZNT d'Hunëtë en février 2008 (L12) et février 2009 (L15), les bénitiers collectés en 2008 en ZNT sont regroupés en lot (B7 + B8 + B9).

Les valeurs des Cl₅₀ du test N2A sont comprises entre 40 et 215 µg d'extrait / mL pour 2008 (L12) et entre 6 et 281 µg d'extrait / mL pour 2009 (L15). Ces analyses de cytotoxicité indiquent que les bénitiers sont toxiques sur l'ensemble de la zone de pêche de Hunëtë (ZT et ZNT) ($p = 0,234$ (2008, L12) et $p = 0,183$ (2009, L15), présentant une toxicité dont l'action est non spécifique des CSSP ($p = 0,450$ (2008, L12) et $p = 0,338$ (2009, L15) et constante sur les années 2008 et 2009 ($p = 0,7649$).

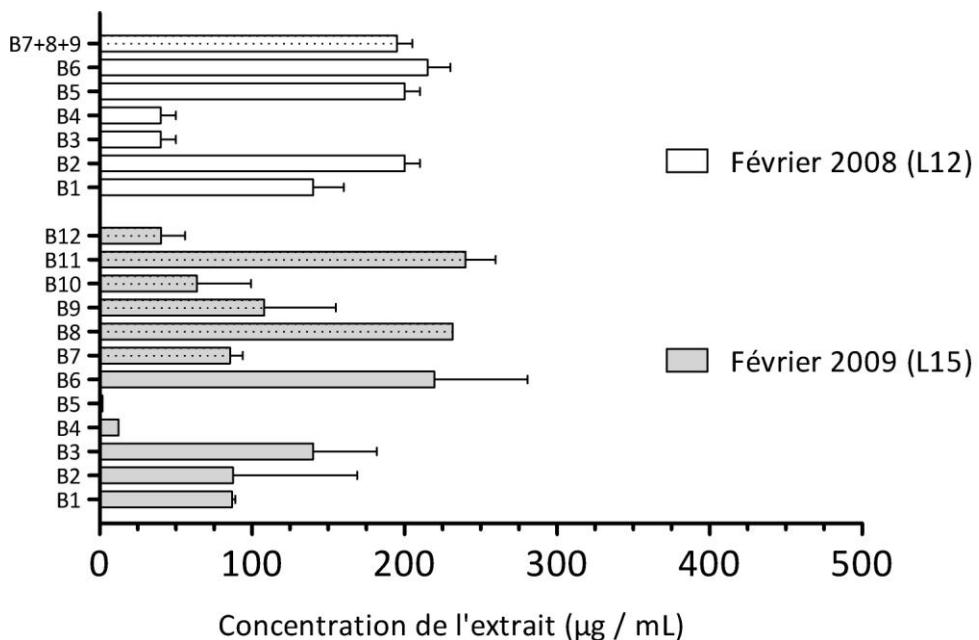


Figure 43 : Valeurs des Cl_{50} (en $\mu\text{g} / \text{mL}$) des extraits liposolubles de bénitiers récoltés en février 2008 (L12) et 2009 (L15) ; les barres pointillées représentent les valeurs Cl_{50} de bénitiers collectés en ZNT.

En outre, on observe des différences significatives interindividuelles qui ne s'expliquent pas par la taille des individus: L12, moyenne = $19,1 \pm 3,5$ cm et L15, moyenne = $19,1 \pm 2,3$ cm. Notre hypothèse était que les bénitiers les plus toxiques étaient ceux se situant à proximité des mottes de cyanobactéries mais en raison d'une localisation du prélèvement par zone (ZT vs ZNT) et non de manière plus précise (par coordonnées GPS par exemple), il ne nous a pas été possible de vérifier cette hypothèse.

Effets cytotoxiques des extraits liposolubles de bénitiers purifiés en chromatographie basse pression.

Différentes fractions susceptibles de contenir les composés d'intérêt, issues des deux purifications en chromatographie sur colonne de Florisil® et de Sephadex® LH20 des extraits liposolubles des lots de bénitiers sont testées sur test N2A :

- Purifications du lot de bénitiers (ZT, L3) (figure 40) : fractions E1 (ou extrait liposoluble 1), E1F4, E1F5 et E2F2 (figure 44),
- Purifications du lot de bénitiers « témoins » A (2006) (tableau 29) : fractions E1 (ou extrait liposoluble 1), E1F5, E1F6 (figure 45).

Les figures 44 et 45 représentent les effets cytotoxiques des différentes fractions testées selon une gamme de 0 à 208 μg d'extrait / mL.

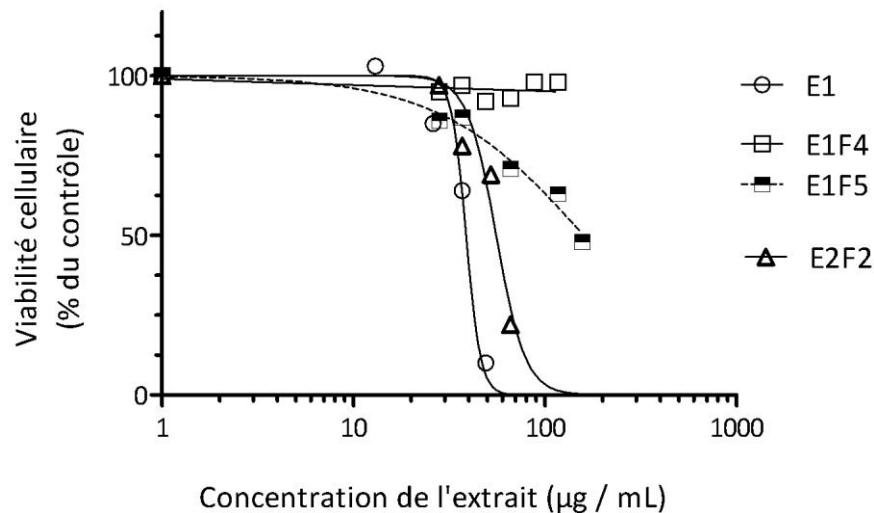


Figure 44 : Effets cytotoxiques des extraits de bénitiers collectés à Lifou en ZT en novembre 2005 (L3) ; E1 : extrait liposoluble (1), E1F4 et E1F5 : fractions obtenues par purification sur colonne de Florisil®, E2F2 : étape 2 de purification sur colonne de Sephadex® LH20.

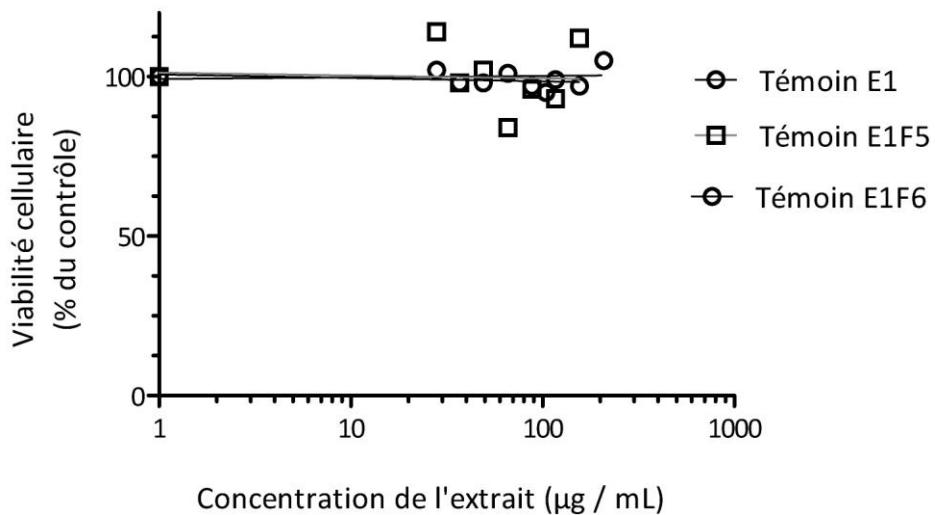


Figure 45 : Effets cytotoxiques des extraits liposolubles de lot de bénitiers « témoin » A (2006) ; E1 : extract liposoluble (1), E1F5 et E1F6 : fractions obtenues par purification sur colonne Florisil®.

Les fractions E1 et E2F2 du bénitier toxique ont provoqué des effets cytotoxiques +OV et -OV similaires ($p > 0,05$) (courbes -OV non présentées), cela indique qu'ils n'ont pas une activité spécifique des CSSP. La fraction E1 a induit une forte cytotoxicité équivalente à celle induite par la fraction E2F2 : $IC_{50} = 38,8$ et $55,7$ mg d'extrait / mL respectivement.

L'étape de purification n'a donc pas eu d'influence sur la toxicité de la fraction E2F2 alors qu'on pouvait s'attendre à une augmentation de celle-ci (augmentation de la pureté de l'extrait). Quant aux fractions E1F5 et E1F4, elles démontrent respectivement une faible toxicité et un effet atoxique. Les composés de polarité plus faible sont donc extraits en faible quantité par E1F5 et majoritairement par E1F6. Cette dernière n'a pas pu être testée en N2A, étant donné les faibles quantités extraites, nous avons voulu privilégier la 2ème étape de purification où les fractions E1F5 et E1F6 sont rassemblées et purifiées.

En ce qui concerne le lot de bénitiers « témoin » A (2006), aucune des fractions testées n'a révélé de toxicité, particulièrement la fraction E1F6 censée être la fraction contenant les substances toxiques (figure 45). Ceci est donc en faveur de l'innocuité de cet échantillon qui comparé à l'analyse des fractions équivalentes pour le bénitier toxique, nous permet de s'assurer de l'effet spécifique de ces composés toxiques.

II.3.c.2.c.(iv) Test RBA

Les fractions ayant montré un important effet cytotoxique sont ensuite testées en RBA afin de tenter de préciser le mode d'action des composés présents dans ces fractions.

Evaluation de la toxicité des bénitiers collectés en ZT.

L'extrait liposoluble (E1) ainsi que les fractions E1F6 et E2F2 issues de la purification par chromatographie basse pression sur Florisil® et Sephadex® respectivement, du *pool* de bénitiers collectés en ZT (L3) ont été analysés. La figure 46 illustre les courbes de compétition de chacun de ces extraits ; le tableau 32 donne les valeurs de IC_{50} correspondantes. A titre de comparaison, les valeurs obtenues précédemment pour le *pool* de bénitiers collectés en début d'étude (avril 2005, L2) sont également indiquées (Laurent *et al.*, 2008).

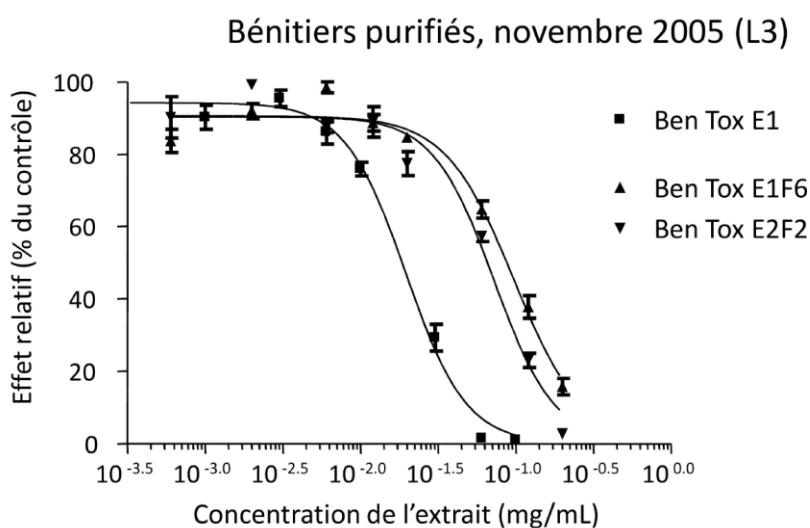


Figure 46 : Courbes de compétition du test RBA des extraits (mg / mL) de bénitiers de Lifou collectés en novembre 2005 (L3).

Tableau 32 : Toxicité exprimée en mg eqv de P-CTX-3C / g d'extrait des extraits et fractions analysés par le test RBA.

Traitement chimique	Référence	mg eqv P-CTX-3C / g d'extrait
Séparation liquide - liquide	Bénitiers collectés en ZT, L2	E1
		10,4 ± 3,3
Purification Florisil (étape 1)	Bénitiers collectés en ZT, L3	E1F6
Purification Sephadex LH20 (étape 2)		E2F2
		15,65 ± 5,78
		3,04 ± 0,25
		4,04 ± 0,01

Les extraits liposolubles de bénitiers collectés en novembre 2005 (L3) sont plus toxiques ($15,65 \pm 5,78$ mg eqv P-CTX-3C / g d'extrait) que ceux collectés en avril 2005 (L2) ($10,4 \pm 3,3$ mg eqv P-CTX-3C / g d'extrait). En d'autres termes, la concentration de composés de haute affinité pour le site 5 des CSSP bioaccumulés dans les bénitiers de ZT est devenue plus importante après un délai de sept mois.

En ce qui concerne les fractions E1F6 et E2F2, le test RBA démontre une forte diminution de l'activité toxique spécifique du site 5 des CSSP : les fractions E1F6 et E2F2 possèdent une même toxicité (≈ 3 à 4 mg eqv P-CTX-3C / g d'extrait). Cela suggère que lors de l'étape 1 de purification, la toxicité n'a pas été séparée dans la fraction supposée. Il est envisageable que la forte toxicité évaluée en E1 se soit retrouvée au niveau de la fraction E1F7. Par contre, la purification sur Sephadex® semble être efficace puisque le rendement de toxicité est de 130% pour E2F2 démontrant l'efficacité de l'étape 2 de purification avec une augmentation de la toxicité.

Enfin, on constate que les données obtenues par RBA versus test N2A ne montrent pas une bonne corrélation entre elles ce qui semble indiquer que les pools de bénitiers de la ZT contiennent à la fois :

- i) des composés liposolubles agissant spécifiquement sur le site 5 des CSSP (test RBA +) et dont la polarité est inférieure à celle des CTXs et
- ii) des composés liposolubles cytotoxiques de polarité similaire à celle des CTXs mais dont l'action n'est pas spécifiques des CSSP.

II.3.c.3 Poissons

II.3.c.3.a Récoltes et données d'extraction

Un total de 25 poissons (22 perroquets, 2 loches saumonées et 1 murène) a été collecté dans la zone de pêche de Lifou de 2007 à 2009 (L9, L12 et L15). Chaque poisson est extrait

individuellement sur Sep-pak® en vue de son analyse par test N2A. L'identification des espèces, les caractéristiques morphométriques et les données d'extraction sont synthétisées dans le tableau 33.

Les perroquets sont les espèces-sentinelles que nous avons choisi de cibler dans cette étude. Rappelons que l'apparition d'une ciguatoxicité au niveau de ce premier maillon de la chaîne trophique serait le signe de l'émergence de la ciguatéra dans la zone d'étude considérée (cf. ch1.II.7).

Scarus schlegeli (Bleeker, 1861) est le perroquet le plus fréquemment pêché dans la zone. D'après les données de la littérature, ce perroquet dénommé perroquet à bande jaune est signalé comme exempt de CTXs. *Scarus rivulatus* (Valenciennes, 1840) est un perroquet également commun dans les lagons calédoniens. Appelé encore perroquet à museau rayé, il est lui aussi réputé exempt de CTXs. Ces deux espèces de perroquet principalement corallivores ont un comportement alimentaire comparable (niveau trophique de 2,0 selon Fishbase). *S. schlegeli* est inféodé aux zones récifales jusqu'à 50 m, tandis que *S. rivulatus* reste plutôt dans la zone lagunaire jusqu'à 10 m.

Plectropomus leopardus (Lacepède, 1802), appelée encore loche saumonée ou loche à petits points, est très fréquente dans les eaux calédoniennes. Son niveau trophique est de 4,49. Apprécier des consommateurs, elle est généralement considérée comme non ciguatérique localement, bien que la base de données Fishbase la répertorie comme ayant provoqué des intoxications ciguatériques.

Gymnothorax javanicus (Bleeker, 1859) collectée en 2007 (L9), est reconnue pour être fortement ciguatérique. Ichtyophage, la murène javanaise est située en haut de la chaîne alimentaire avec un niveau trophique de 3,87.

II.3.c.3.b Données de toxicité

L'évaluation de la toxicité des poissons collectés dans la zone de pêche de la tribu d'Hunêtë sur trois années (2007, 2008 et 2009) est présentée sous la forme de courbes de cytotoxicité en fonction d'une gamme de concentrations d'extraits de chair (exprimées en mg eqv de chair / mL) des perroquets (*S. schlegeli* et *S. rivulatus*) (figure 47), de la murène (*Gymnothorax javanicus*) et de la saumonée (*Plectropomus leopardus*) (figure 48). Seules les valeurs de cytotoxicité obtenues en conditions (+OV) sont indiquées.

Les Cl₅₀ observées en conditions (+OV) sur l'ensemble des extraits de poissons sont significativement différentes de celles obtenues en conditions (-OV) (p moyen < 0,01). Ceci indique que les composés toxiques présents chez les poissons ont une **action spécifique sur les CSSP, typique de l'action des CTXs**.

La ciguatoxicité des poissons a été estimée à partir des valeurs de Cl₅₀ exprimées en mg eqv de chair de poisson / mL (tableau 34) et des caractéristiques de la courbe de régression (coefficient de Hill et R²) (données non présentées).

Tenant compte de l'effet toxique chez l'Homme (100 pg éqv de P-CTX-1B / g de chair ; Hamilton *et al.*, 2009) et des Cl₅₀ de toxines pures obtenues dans des conditions expérimentales similaires (O, 10 mM et V, 1 mM) (Dechraoui, 1999), nous pouvons estimer la limite de toxicité pour l'Homme, dans nos conditions à **540 µg éqv d'extrait / mL**.

Tableau 33 : Caractéristiques et données d'extraction rapide des poissons récoltés en 2007, 2008 et 2009 à Lifou (ZT (rose), ZNT (bleu) ; MF : masse de chair fraîche.

Réf.	Espèce	Longueur (cm)	Masse (g)	Fraction 2		Fraction 2'	
				Masse (g)	%MF	masse (g)	%MF
L9	Février 2007						
LS	<i>Plectropomus leopardus</i>	46	1300	0,000	0,00	-	-
M	<i>Gymnothorax javanicus</i>	75	690	0,003	0,05	-	-
P1	<i>Scarus</i> sp.	28	500	0,001	0,03	-	-
P2	<i>Scarus</i> sp.	28	460	0,001	0,03	-	-
P3	<i>Scarus</i> sp.	28	460	0,001	0,01	-	-
P4	<i>Scarus</i> sp.	27	400	0,000	0,01	-	-
P5	<i>Scarus</i> sp.	29	420	0,000	0,01	-	-
L12	Février 2008						
P1	<i>Scarus</i> sp.	-	150	0,137	2,75	0,148	2,95
P2	<i>Scarus schlegeli</i>	23	108	0,038	0,76	0,095	1,90
P3	<i>Scarus schlegeli</i>	28	120	0,052	1,05	0,306	6,12
P4	<i>Scarus schlegeli</i>	36	230	0,080	1,60	0,014	0,27
P5	<i>Scarus schlegeli</i>	32	185	0,307	6,14	0,019	0,37
P6	<i>Scarus schlegeli</i>	27	141	0,350	7,00	0,026	0,53
P7	<i>Chlorurus sordidus</i>	22	68	0,002	0,05	-	-
L15	Février 2009						
P1	<i>Scarus schlegeli</i>	28	56	0,005	0,10	0,007	0,14
P2	<i>Scarus schlegeli</i>	34	94	0,007	0,14	0,010	0,20
P3	<i>Scarus schlegeli</i>	28	131	0,007	0,14	0,009	0,18
P4	<i>Scarus schlegeli</i>	30	54	0,007	0,13	0,010	0,20
P5	<i>Scarus schlegeli</i>	24	31	0,009	0,18	0,015	0,31
P6	<i>Scarus schlegeli</i>	31	89	0,009	0,19	0,015	0,31
P7	<i>Scarus schlegeli</i>	29	73	0,009	0,18	0,014	0,28
P8	<i>Scarus rivulatus</i>	23	31	0,008	0,15	0,012	0,25
P9	<i>Scarus rivulatus</i>	21	54	0,009	0,19	0,009	0,18

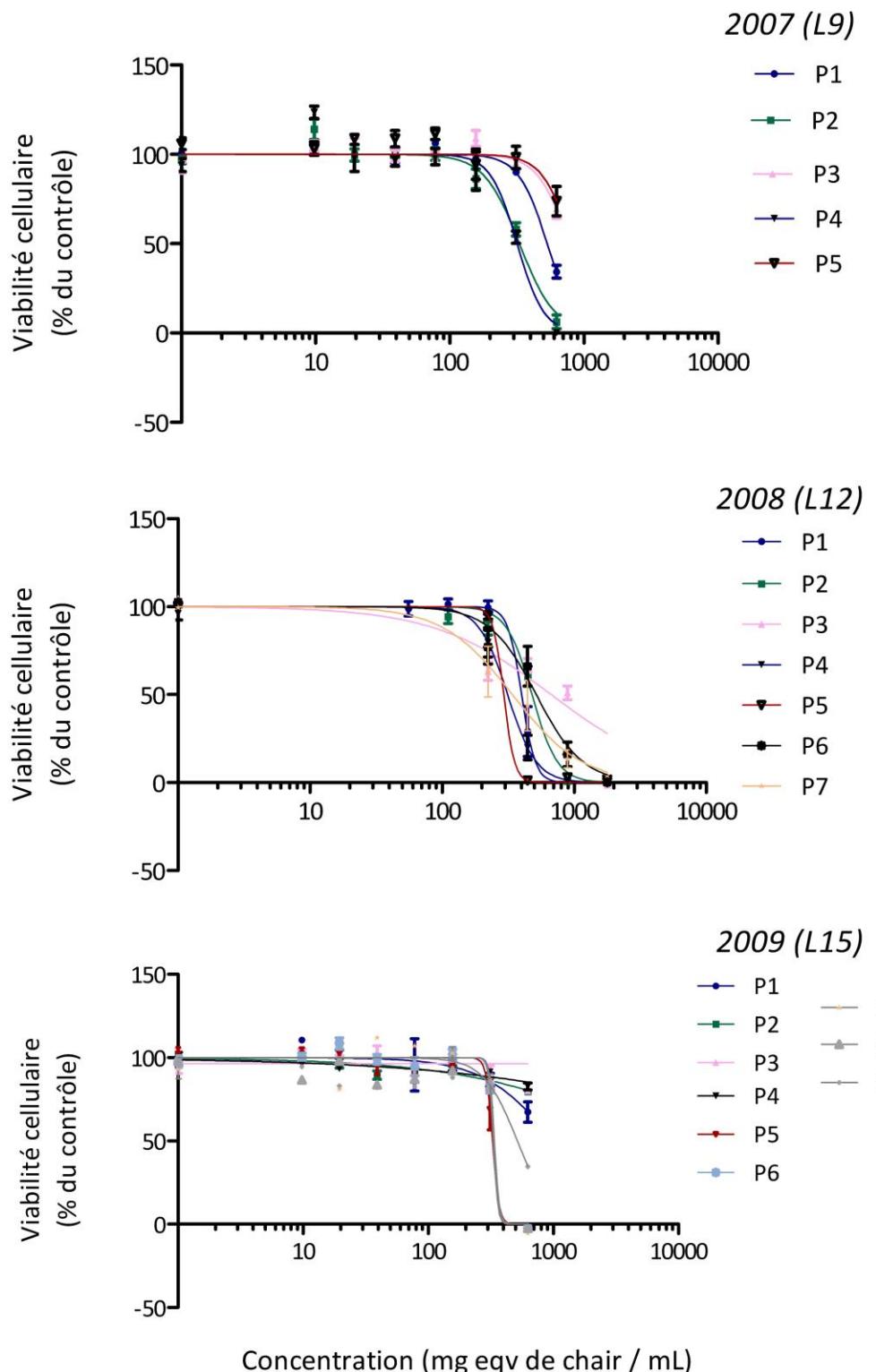


Figure 47 : Effets cytotoxiques en conditions (+OV) des extraits (en mg eqv / mL) de chair de perroquets collectés dans la zone de pêche de Hunëtë en 2007, 2008 et 2009.

Tableau 34 : Valeurs des Cl_{50} en mg eqv de chair / mL et toxicité des poissons collectés dans la zone de pêche de Hunëtë en 2007, 2008 et 2009 (L9, L12 et L15). Toxicité : Atoxique > 540 mg eqv de chair de poisson / mL ; Toxique < 540 mg eqv de chair de poisson / mL.

	Espèces de poissons	Cl_{50} mg eqv de chair de poisson / mL.	Toxicité
L9	Février 2007		
P1	<i>Scarus sp.</i>	533 ± 27	Toxique
P2	<i>Scarus sp.</i>	331 ± 29	Toxique
P3	<i>Scarus sp.</i>	781 ± 194	Atoxique
P4	<i>Scarus sp.</i>	318 ± 39	Toxique
P5	<i>Scarus sp.</i>	813 ± 476	Atoxique
S	<i>Plectropomus leopardus</i>	1 380	Atoxique
M chair	<i>Gymnothorax javanicus</i>	146 ± 24	Toxique
M foie	<i>Gymnothorax javanicus</i>	6 ± 3	Toxique
L12	Février 2008		
P1	<i>Scarus sp.</i>	400 ± 145	Toxique
P2	<i>Scarus schlegeli</i>	479 ± 32	Toxique
P3	<i>Scarus schlegeli</i>	672 ± 182	Atoxique
P4	<i>Scarus schlegeli</i>	314 ± 39	Toxique
P5	<i>Scarus schlegeli</i>	293 ± 25	Toxique
P6	<i>Scarus schlegeli</i>	517 ± 107	Toxique
P7	<i>Chlorurus sordidus</i>	341 ± 123	Toxique
L15	Février 2009		
P1	<i>Scarus schlegeli</i>	ND	Atoxique
P2	<i>Scarus schlegeli</i>	ND	Atoxique
P3	<i>Scarus schlegeli</i>	ND	Atoxique
P4	<i>Scarus schlegeli</i>	ND	Atoxique
P5	<i>Scarus schlegeli</i>	328	Effet matrice?
P6	<i>Scarus schlegeli</i>	335	Effet matrice?
P7	<i>Scarus schlegeli</i>	339	Effet matrice?
P8	<i>Scarus rivulatus</i>	332	Effet matrice?
P9	<i>Scarus rivulatus</i>	516 ± 72	Effet matrice?

En 2007, les poissons perroquets du genre *Scarus* (P1, P2 et P4) sont ciguatoxiques (valeurs de Cl_{50} = 318 à 533 mg eqv / mL), tandis que les perroquets P3 et P5 n'ont pas démontré de ciguotoxicité. En 2008, les perroquets pêchés dans la ZT sont quasiment tous ciguatoxiques (excepté P3, 672 ± 182 mg eqv / mL), les Cl_{50} sont de l'ordre de 293 ± 25 (L12, P5) à 517 ± 107 (L15, P6). En 2009, 4 perroquets sur 6 sont atoxiques dans la ZT. Par contre, il n'a pas été possible d'évaluer les Cl_{50} des 5 autres perroquets qui montre à priori un effet matrice. En effet, la régression sigmoïdale des données de cytotoxicité n'est pas satisfaisante (coefficient de Hill > 5, 0 et $R^2 < 0,6$), ceci est clairement visible en figure 47 (2009) où l'on peut noter des courbes avec des pentes très abruptes (P4 à P9), non caractéristiques d'un effet cytotoxique dose-dépendant.

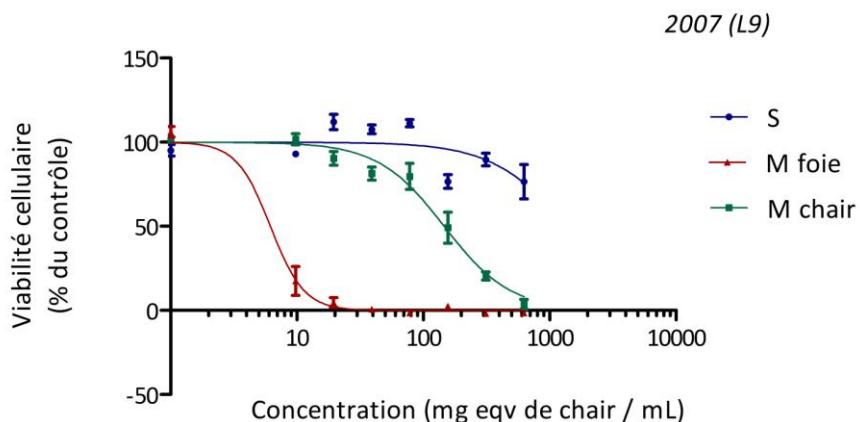


Figure 48 : Effets cytotoxiques des extraits (en mg eqv / mL) de saumonée (S), de chair (M chair) et de foie (M foie) de murène collectés dans la ZT en 2007 (L9).

La saumonée (*Plectropomus leopardus*) n'a pas révélé de toxicité (figure 48). En revanche, la murène pêchée dans la ZT est fortement toxique : l'extrait de foie a induit une toxicité de 100% dès 10 mg eqv de foie / mL (la plus faible concentration testée). La chair est également fortement ciguatoxique ($Cl_{50} = 146 \pm 24$ mg eqv de chair / mL). Les résultats de cytotoxicité concernant ces deux espèces sont en accord avec les connaissances locales, à savoir que la saumonée est réputée indemne de ciguatera tandis que la murène présente un fort risque ciguatérique.

Les perroquets pêchés dans la zone sont ciguatoxiques durant la saison 2007 avec un pic de toxicité sur notre échantillonnage en 2008 et la toxicité des poissons semble diminuer en 2009. Il est possible que cela soit dû aux faibles teneurs présentes alors dans les chairs de poissons.

Sur l'ensemble des résultats de cytotoxicité, il n'a pas été possible d'observer une différence entre les poissons pêchés dans la ZT et ZNT vu le faible nombre d'échantillons représentatifs de la ZNT qui ont pu être analysés. En tout état de cause, il semble difficile de

délimiter de manière stricte une zone toxique d'une zone indemne, puisque les poissons et plus particulièrement le perroquet ont un comportement alimentaire qui les rend peu sédentaires.

II.3.d Identification des toxines

Fractions liposolubles : détection des CTXs

Certains extraits issus de la purification du pool de bénitiers toxiques collectés en novembre 2005 (L3) (figure 40) ont été analysés par HPLC-MS/MS à l'Université de Queensland dans le laboratoire de Richard Lewis pour la détection spécifique des CTXs.

Brièvement, les conditions HPLC-MS/MS appliquées consistaient en l'utilisation d'une colonne C18 (Phenomenex, 50 x 2 mm, 5 µm) associée à une pré-colonne C18 (Phenomenex C18, 4 x 2,1 mm, 5 µm) et l'utilisation de solvants A : H₂O : 0,1% acide formique et B : 90% acétone : 10% H₂O : 0,1% acide formique selon un gradient programmé (A de 80 - 90% à 10 - 0% pendant 30 mn) à 350 µL / min, couplée à un spectromètre de masse API 2000, Triple Quadrupole (AB Sciex Instruments).

La qualité des fractions chargées en lipides, bien qu'ayant subi une étape de purification supplémentaire sur cartouche SPE en phase normale, ne s'est pas révélée suffisante pour l'obtention de chromatogrammes exploitables. L'analyse des fractions E1F3, E1F4 et E2F2 n'a pas permis non plus de mettre en évidence la présence de composés proches des CTXs dans ces extraits.

Fractions hydrosolubles : détection de composés hydrosolubles

Les extraits hydrosolubles des cyanobactéries et des bénitiers collectés en novembre 2005 (L3) dans la ZT ont été analysés en GC-MS. Ces analyses ont été réalisées dans l'Unité des Cyanobactéries de l'Institut Pasteur de Paris par Annick Méjean et Caroline Peyraud-Thomas.

L'analyse des séquences ITS des mattes de cyanobactéries a confirmé la présence majoritairement de *H. lyngbyaceum*.

Pour la première fois chez une cyanobactérie marine et en particulier chez *Hydrocoleum*, la présence de l'HAnTX-a et des traces d'AnTX-a sont détectées par GC-MS. La présence de cette cyanotoxine a également pu être identifiée dans les chairs de bénitier avoisinant les efflorescences. La détection de cette toxine à la fois dans les cyanobactéries et les bénitiers avoisinants appuie l'hypothèse de la contamination de la chaîne trophique par cette cyanotoxine.

Ces données ont fait l'objet d'une publication dans la revue Toxicon :

Méjean A., Peyraud-Thomas C., Kerbrat A.S., Golubic S., Pauillac S., Chinain M., Laurent D. 2009. First identification of the neurotoxin homoanatoxin-a from mats of *Hydrocoleum lyngbyaceum* (marine cyanobacterium) possibly linked to giant clam poisoning in New Caledonia. *Toxicon*, doi:10.1016/j.toxicon.2009.10.029.

Fractions hydrosolubles et liposolubles : analyse multi-toxines marines

Le recours à l'analyse multi-toxinique par LC-MS/MS mise au point au labatoire des Phycotoxines de l'IFREMER dirigé par Zouher Amzil a permis le criblage des différentes familles de cyanotoxines et de phycotoxines suivantes dans nos échantillons de cyanobactéries et de bénitiers:

- Neurotoxines : AnTX-a, HAnTX-a,
- Hépatotoxines : cylindrospermospine, nodularine-R et microcystines (LR),
- Toxines paralysantes : carbamates (STX, NEO-STX, GTX-1 à GTX-4) ; N-sulfocarbamoyle (GTX-5, GTX-6 et C1 à C4), décarbamoyles (dc-STX, dc-NEO, dc-GTX-1 à dc-GTX-4),
- PTXs : PTX, 42-OH PTX, ovatoxin-A, ostreocin-D, mascarenotoxins A et B,
- Toxines diarhéiques : AO, DTXs, pectenotoxines, azaspiracides, yessotoxines et
- Toxines à action rapide (FATs) : gymnodimines, spirolides.

L'analyse des extraits hydrosolubles des bénitiers collectés en novembre 2005 (L3), février 2007 (L9) et février 2008 (L12), et celle des mattes de cyanobactéries collectées en novembre 2009 (*Oscillatoria cf. bonnemaisonii*, *T. erythraeum* et *P. laysanense*) n'a révélé la présence d'aucune des toxines sus-citées.

II.3.e Synthèse : évolution de la toxicité sur le site d'étude de Hunëte

Afin d'avoir une vue d'ensemble de l'évolution de la toxicité sur le site de Hunëte pendant toute la période d'étude, le tableau 35 synthétise l'ensemble des données de toxicité des organismes collectés par mission. Seules les données concernant les extraits issus de l'extraction méthanolique (extrait hydrosoluble (1) et liposoluble (1)) sont présentées. Pour le test N2A, toutes les CI_{50} calculées sont les valeurs obtenues en conditions +OV.

Tableau 35 : Synthèse des toxicités mises en évidence à l'aide des tests souris, N2A et RBA, sur les échantillons de cyanobactéries, bénitiers et poissons collectés de 2005 à 2008 dans la zone de pêche dite toxique de Lifou : test N2A : Cl_{50} exprimée en $\mu\text{g eqv d'extrait / mL}$ (ou $\mu\text{g d'extrait liposoluble / mL}$) et test RBA : toxicité exprimée en $\mu\text{g eqv. P-CTX-3C / g eqv d'extrait liposoluble}$ (ou en $\mu\text{g eqv. P-CTX-3C / g d'extrait liposoluble}$)

Date	Cyanobactéries majoritairement présentes	Zones	Test	Pool de cyanobactéries ZT		Pool de bénitiers ZT		Poisson
				Composés hydrosolubles	Composés liposolubles	Composés hydrosolubles	Composés liposolubles	
2005/04	L2 <i>H. lyngbyaceum</i>	5A 5B	Souris	Tox ++	Tox ++	Tox ++	Tox ++	
			N2A		+++			
			RBA		(3,05)		10,4 ± 3,21	
2005/11	L3 <i>H. cf. glutinosum</i> , <i>O. bonnemaisonii</i> , <i>O. holdeni</i>	4A	Souris	Tox +	Tox ++	Tox ++	Tox ++	
			N2A		197 (43)		38,8	
			RBA		2,25 (8,87)		15,6 ± 0,31	
2006/03	L5 <i>O. subuliformis</i> , <i>H. glutinosum</i>	4A	Souris	Tox +	Tox ++	Tox ++	Tox ++	
			RBA		(7,41)			
2006/05	L6 <i>O. subuliformis</i> , <i>O. cf. bonnemaisonii</i>	6A	Souris	Tox ++	Tox ++			
			N2A		330 (88)			
			RBA		0,56			
2006/08	L7 N <i>P. laysanense</i> , <i>H. lyngbyaceum</i>	5C	Souris	Tox ++	Tox ++			
			N2A		4 (27)			
			RBA		1,69 (8,68)			
2006/08	L7 O <i>S. cf. weissii</i>	5B	Souris	Tox ++	Atox			
			N2A		6			
			RBA		1,14			
2007/08	L9 <i>H. lyngbyaceum</i> , <i>Oscillatoria sp.</i> , <i>P. laysanense</i>	6A	Souris	Tox ++	Tox +	Tox ++	Tox +	
			N2A		260 (179)		129	60% ciguatoxique
					2,84			

			RBA					
2008/02	L12	<i>H. glutinosum</i>	4C	Souris	Tox ++		Tox ++	Tox ++
				N2A		ND (134)		40 - 125
				RBA		< 0,31		85% ciguatoxique
				Souris	Tox ++			
2008/06	L13	<i>S. weissii</i>	5C	N2A		ND (274)		
				RBA		0,86		
				Souris	Tox ++	Tox +		
				N2A		98		
		<i>Trichodesmium sp.</i>	5A	RBA		5,07		
				Souris			Tox ++	Tox ++
2009/02	L15	<i>O. cf. bonnemaisonii</i>	5C	N2A				6 - 281
				Souris	Tox ++			50% atoxique 50% ???
		<i>O. cf. bonnemaisonii</i>	5B 5C 6B	N2A		254		
				RBA		1,03		
		<i>T. erythraeum</i>	5A	Souris	Tox ++			
				N2A		92		
				RBA		1,65		
				Souris	Tox ++			
		<i>P. laysanense</i>	5B	N2A		97		
				RBA		1,10		

En résumé, les points importants à retenir sont :

Toxicité des cyanobactéries

L'ensemble des cyanobactéries de l'ordre des Oscillarioles montre un potentiel toxique similaire d'un point de vue qualitatif sur l'ensemble des prélèvements (tableau 36). En comparant les mêmes niveaux d'extractions (extrait liposoluble 1 et extrait hydrosoluble 1), les valeurs de toxicité des extraits liposolubles obtenues par le test N2A sont de l'ordre de 0,6 à 9,4 µg eqv de P-CTX-3C / g d'extrait (Cl_{50}) contre 3 à 8 µg eqv P-CTX -3 C / g d'extrait lorsque analysées au moyen du test RBA.

Le test N2A indique que les substances responsables de ces effets cytotoxiques ont une polarité similaire à celle des CTXs et qu'elles n'agissent pas spécifiquement sur les CSSP.

Tableau 36 : Valeurs de Cl_{50} des extraits liposolubles des cyanobactéries évaluées par le test N2A.

		mg ou mg eqv d'extrait / L	µg eqv PbTx-3 / g eqv d'extrait	ng eqv P-CTX-3C / g eqv d'extrait
E1	Moyenne	190	0,1	1,3
	Toxicité minimum	435	0,1	0,6
	Toxicité maximum	27	0,8	9,4
E1 purifié F2 (90 / 10)	Moyenne	149	0,2	1,7
	Toxicité minimum	300	0,1	0,8
	Toxicité maximum	4	5,6	63,6

Les mattes dominées par *P. laysanense* et *S. weisii* montrent la plus forte toxicité. Le complexe cytotoxique en cause semble impliquer à la fois des substances de même polarité que les CTXs et des composés moins polaires (test N2A : toxicité de la fraction F2 **et** F3). Les mattes les plus toxiques sont collectées en août 2006 (L7), période à laquelle le risque semble donc le plus élevé.

Enfin, les tests souris réalisés sur les cyanobactéries collectées de 2005 à 2009 ont également mis en évidence une toxicité dans les fractions hydrosolubles s'accompagnant de symptômes de type paralysant ($DL_{50} \approx 1$ à 2 mg / g de souris).

Toxicité des bénitiers

A l'exception du témoin (2006), tous les bénitiers analysés individuellement ou par lot semblent présenter un complexe toxinique composé à la fois de toxines de type CTX et paralysante.

Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus par analyses neurophysiologiques des bénitiers collectés en ZT qui démontraient une activité CTX-like associé à une activité de type PSP, et la détection de traces de STX en faibles quantités.

Les tests souris effectués sur les bénitiers collectés de 2005 à 2009 ont mis en évidence la toxicité des fractions hydrosolubles avec des symptômes de type paralysant ($DL_{50} \approx 4$ à 5 mg / g de souris), et celle des extraits lipidiques de type *CTX-like*. Aucune différence n'est relevée entre les bénitiers collectés en ZT et en ZNT.

Les analyses des extraits liposolubles et des fractions issues des deux purifications a permis d'isoler des composés agissant spécifiquement sur le site 5 des CSSP de polarité plus faible que les CTXs (test RBA) et des composés cytotoxiques non spécifiques des CSSP et de polarité similaire aux CTXs (test N2A). Les toxicités en test RBA des extraits liposolubles de bénitiers non purifiés sont de l'ordre de 10 à 15 µg eqv P-CTX-3C / g d'extrait. Leur toxicité (Cl_{50}) en test N2A vont de 6 à 281 µg d'extrait / mL (moyenne = 96,9 µg d'extrait / mL).

Les bénitiers les plus toxiques sont collectés en 2009 et aucune tendance (diminution ou augmentation) de la toxicité sur les 5 années d'analyses qu'a duré l'étude n'est observée.

Toxicité des poissons

Les poissons de la zone d'étude sont ciguatoxiques sur l'ensemble de la zone en 2007 (L9) (60% des poissons perroquets récoltés), cette toxicité est de 85% en 2008 (L12) et au maximum à 50% en 2009 (50% atoxique et 50% non déterminé).

Les analyses de toxicité des poissons sur trois ans montrent une toxicité de type ciguatérique. Cependant, les données obtenues sur les 3 années d'échantillonnage (2007 à 2009) ne permettent pas de conclure quant à une tendance à l'augmentation ou la diminution de la contamination des poissons dans la zone de pêche d'Hunëtë.

II.4 Discussion

II.4.a Caractérisation de la toxicité

Attribution de la toxicité à une espèce de cyanobactéries.

Dans le cadre de cette thèse, les analyses réalisées sur les échantillons de mattes de cyanobactéries dominant en ZT ont permis d'évaluer leur potentiel toxique global. Toutefois les échantillons de cyanobactéries récoltés étant rarement purs (souvent associés à des organismes du phytoplancton et zooplancton ou à des débris coralliens), il convient de rester prudent quant à l'hypothèse de l'origine cyanobactérienne des toxicités observées. Pour tenter de répondre formellement à cette question, plusieurs essais de mise en culture en milieu liquide ou gélosé des filaments isolés *in situ* ont été tentés. Ces essais indiquent que ces filaments peuvent se maintenir jusqu'à cinq semaines, mais des progrès restent à faire notamment en ce qui concerne la sélection des milieux appropriés et les conditions de culture axénique.

Identification des toxines impliquées

L'ensemble des données toxicologiques et des données épidémiologiques confirme la présence d'un **complexe toxinique** à la fois dans les mattes de cyanobactérie et dans les bénitiers récoltés dans la ZT. A ces deux niveaux de la chaîne trophique, les résultats sont en faveur de composés hydrosolubles à activité paralysante et liposolubles à activité de type CTX.

En termes quantitatifs, les potentiels toxiques des bénitiers semblent être supérieurs laissant suggérer un phénomène de bioaccumulation.

Composés toxiques hydrosolubles

Les substances hydrosolubles présentes dans les mattes de cyanobactéries ont montré une toxicité aigüe chez les souris avec une action rapide caractéristique des STXs ou des AnTXs. L'absence de symptôme d'hypersalivation exclue la présence de l'AnTX-a (s). L'identification formelle de l'AnTX-a et de l'HAnTX-a chez *H. lyngbyaceum* (Méjean *et al.*, 2009) suggère fortement que les Oscillarioles collectées à Lifou, à l'origine des mêmes symptômes chez la souris, synthétisent ces neurotoxines. Les alignements des séquences ITS 16S-23S montrent une forte proximité génétique au sein de ces Oscillarioles (*H. lyngbyaceum*, *H. glutinosum*, et deux espèces d'*Oscillatoria*, *O. sancta* et *O. formosa*). On peut donc raisonnablement penser qu'elles peuvent synthétiser de l'AnTX-a et de l'HAnTX-a. Cette hypothèse est également appuyée par la présence de ces neurotoxines chez 15 Oscillarioles d'eau douce dont les genres sont communs avec ceux rencontrés à Lifou (Cadel-Six *et al.*, 2007). De plus, ces éléments rejoignent les hypothèses émises précédemment par Yasumoto *et al.* (1977) qui avaient mis en évidence dans le contenu intestinal de perroquet (*Scarus gibbus*) la présence d'une substance paralysante sur souris à action rapide, de faible poids moléculaire et soluble à l'acétone. Hawser *et al.* (1991) citent l'AnTX-a comme probable toxine présente chez *Trichodesmium*, enfin Endean *et al.* (1993) démontrent la présence d'un alcaloïde chez cette même Oscilloriale.

En outre, la présence concomitante de l'HAnTX-a chez *H. lyngbyaceum* et dans les chairs de bénitiers (Méjean *et al.*, 2009) associés aux symptômes rapides observés à la consommation des poissons et des bénitiers supporte l'occurrence de ces neurotoxines hydrosolubles dans l'ensemble des bénitiers récoltés durant l'étude qui, d'après la population, causeraient les mêmes symptômes.

Composés toxiques liposolubles

Dans les **cyanobactéries et les bénitiers**, nous avons pu détecter la présence de composés cytotoxiques d'action non spécifique des CSSP (test N2A) de polarité inférieure à celle des CTXs, ainsi que de composés liposolubles de haute affinité pour le site 5 des CSSP de polarité similaire à celle des CTXs (test RBA).

En tenant compte de ces résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse suivante : la cytotoxicité observée et analysée comme non spécifique des CSSP est une résultante d'actions : l'action activatrice de composés agissant spécifiquement sur les CSSP serait contrebalancée par

la présence concomitante d'un ou de plusieurs composés non-spécifiques des CSSP, mais inhibant leur activité. Ces derniers ne sont pas détectés par le test RBA, ils n'agissent donc pas spécifiquement sur le site 5 du CSSP, mais agissent soit sur le CSSP (autre que le site 5) ou sur la pompe Na^+/K^+ -ATP-ase, c'est-à-dire un des effets des potentialisateurs O et V.

L'analyse préliminaire en LC-MS/MS n'a pas mis en évidence de CTXs, mais ces analyses mériteraient d'être réitérées sur une biomasse plus importante et traitée selon des protocoles d'extraction et de purification encore améliorés. En effet, de nombreux auteurs ont également suspecté chez les mollusques ou les herbivores des composés similaires aux CTXs (en activité et en propriétés chimiques) (Yasumoto *et al.*, 1976 ; 1977 ; Chungue, 1977).

Par ailleurs, l'analyse muti-toxines par LC-MS/MS n'a montré la présence d'aucune des toxines ciblées par cette méthode (PTXs, STXs, AnTXs, DSTs et FATs), ni dans les échantillons de cyanobactéries (*Oscillatoria spp.*, *T. erythraeum* et *P. laysanense* collectés en novembre 2009) ni dans les fractions hydrosolubles de bénitiers testés (lots collectés en 2007 et 2008 ; « Témoin » B de 2008).

Ciguatoxicité des poissons

L'analyse des populations de perroquets échantillonnés a montré une cytotoxicité avec une activité spécifique des CSSP (test N2A). De 2007 à 2008, la proportion de spécimens toxiques est passée de 60% des spécimens analysés à 100%, avec toutefois une amélioration observée en 2009 où près de la moitié sont apparus atoxiques (les autres spécimens ayant donné des résultats ambigüs).

Selon les dires de la population, avant les premiers cas déclarés en 2001, les poissons pouvaient être consommés sans risque. Nos travaux ont montré que la ciguatera était bien installée dans la zone d'étude en 2007. Parallèlement, le suivi des populations de dinoflagellés initié dès 2005 n'indique l'occurrence d'aucune efflorescence jusqu'en avril 2010. Si les CTXs détectées dans les poissons de Hunète ont pour origine les *Gambierdiscus*, soit ces efflorescences sont intervenues avant 2005, soit notre stratégie d'échantillonnage (fréquence et distribution) n'a pas permis de les détecter. Une autre explication possible de la présence de ciguatera dans la zone d'étude est l'existence d'une autre source microbienne pour ces composés, en particulier les populations cyanobactériennes observées en permanence dans ce site.

L'analyse des composés hydrosolubles de la chair ou du contenu intestinal pourrait être menée afin de vérifier si ces poissons également sont contaminés par le même type de toxines hydrosolubles d'activité paralysante détectées chez les cyanobactéries, ce qui permettrait d'expliquer les symptômes d'engourdissement de la bouche et de la gorge rapportés lors de la consommation de poisson毒ique.

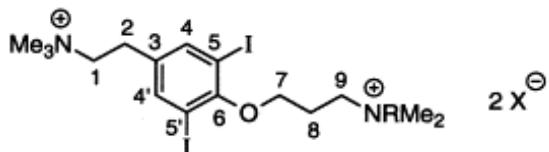
Les bénitiers : Vecteurs potentiels de toxines

Les bénitiers peuvent constituer des supports ou des hôtes pour de nombreux organismes. Cette relation de commensalisme bénéficie par exemple à des petits crustacés comme les *Lithophaga* et *Gastrochaena* mais aussi à des algues ou encore aux cyanobactéries (Bagnis, 1967). Les valves calcaires et résistantes apportent un substrat de fixation idéal sessile (facteurs environnementaux non variants).

Tridacna et *Hippopus* ont causé de sévères intoxications pouvant engendrer la mort (Bagnis, 1967). Une étude menée en 1974 (Bagnis) aux îles Gambier a montré que 4% des cas d'intoxications déclarées ciguatériques sont causés par des bénitiers.

Ces mollusques filtreurs sont de potentiels accumulateurs de divers composés, dont le nombre et la diversité peuvent être importants dans un système complexe comme l'écosystème récifal.

En 1976, Kanno a mis en évidence la toxicité de différentes fractions extraites de turbos (*Turbo*) et de bénitiers (*Tridacna*) récoltés dans la région d'Okinawa (Japon). Les quatre fractions (liposoluble (CH_2Cl_2), acétonique, hydrosoluble et le résidu) obtenues à partir de ces mollusques ont été testées sur souris. *Tridacna squamosa* et *T. crocea* ainsi que trois des espèces de gastéropodes n'ont pas montré de toxicité lors de ces essais. Par contre, *Tridacna maxima* et *Turbo marmorata* se sont révélés fortement toxiques la fraction acétonique de *T. maxima* et la fraction hydrosoluble de *T. marmorata* possédant des toxines de type amines quaternaires (Kanno *et al.*, 1976). En 1999, les turbotoxines A et B (figure 49), dérivés de la diiodotyramine, sont caractérisés dans la fraction hydro-éthanolique de *T. marmorata* (Kighoshi *et al.*, 1999). Ces deux composés sont toxiques sur souris et la turbotoxine-A montre une activité anti-acétylcholinestérasique (Kighoshi *et al.*, 2000).



turbotoxin A (1) R = Me X = CF_3COO
turbotoxin B (2) R = H X = CF_3COO

Figure 49: Structure des turbotoxines-A et -B extraites des viscères du gastéropode *Turbo marmorata* (Kighoshi *et al.*, 2000).

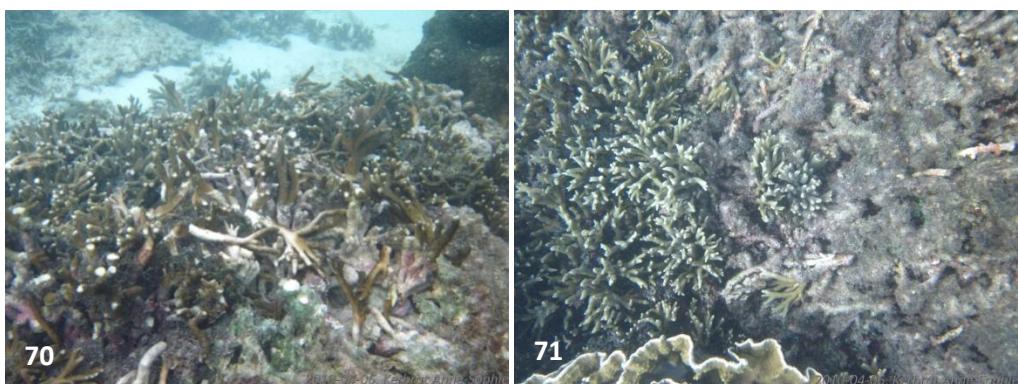
Les bivalves, organismes filtreurs, sont responsables de nombreuses intoxications à travers le monde (Frémy et Lassus, 2001). Par le phénomène de biaccumulation, ces bivalves sont capables de concentrer des quantités de toxines (phycotoxines le plus souvent) jusqu'à des teneurs présentant un risque sanitaire pour l'Homme. C'est pourquoi dans certaines régions, des réseaux de surveillance se sont développés afin de contrôler la salubrité des coquillages destinés à la vente (ex. le Réphy français ou Réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines). Le bénitier, ressource très prisée par les populations des états insulaires du

Pacifique et dont la consommation n'a jamais été soumise à réglementation en termes de santé publique, doit donc également être considéré comme un vecteur potentiel des biotoxines marines présentes dans son environnement.

II.4.b Environnement

Dominance cyanobactérienne et impact sur l'environnement

Les coraux fragilisés soit naturellement (par hydrodynamisme, par exemple), soit par l'action de l'Homme, constituent un terrain favorable à la prolifération de cyanobactéries naturellement présentes dans le milieu, à l'occasion de conditions environnementales favorables. Ces organismes résistants et compétitifs peuvent détruire progressivement les colonies corallines (photos 70 et 71) en les étouffant et en les privant de leur ressource lumineuse. Cette destruction génère ainsi des « substrats vierges » supplémentaires propices au développement de ces cyanobactéries, selon un système de « cercle vicieux » qui contribue à maintenir l'écosystème dans cet état de déséquilibre et de stress. Le corail trouve alors difficilement sa place dans cette compétition entre des organismes relativement fragiles face aux cyanobactéries, organismes ancestraux dotés d'un arsenal de stratégies leur permettant de s'adapter à des conditions même difficiles.



Photos 70 et 71 : Destruction de corail du genre *Acropora* entre la zone 4A et 5A, laissant place au développement progressif de cyanobactérie du genre *Hydrocoleum* dans le zone au pied de la mise à l'eau à Lifou.

Toxicité des cyanobactéries

Comme nous l'avons vu en introduction, la présence à Lifou de plusieurs espèces de cyanobactéries benthiques marines, parfois en populations très abondantes, peut représenter un risque sanitaire pour l'Homme, au regard du potentiel toxinique déjà bien décrit chez leurs cousins d'eau douce.

Actuellement, il n'existe aucune réglementation visant à définir des seuils de salubrité à appliquer aux cyanotoxines potentiellement présentes dans les eaux ou les coquillages, la réglementation française ne concernant en effet que les phycotoxines.

Nos résultats indiquent une variabilité dans la production toxinique chez les cyanobactéries toxinogènes, mise en évidence par l'analyse de la toxicité de *Spirulina weissii* récoltée en mai 2006 (L6) et en juin 2008 (L13) (valeurs des IC_{50} évoluant de 7 à 125 µg eqv d'extrait / ml). Comme nous l'avons abordé dans l'introduction, la production toxinique varie selon la souche ou les facteurs environnementaux (facteurs favorables ou stress) ; leurs caractéristiques et impacts ne sont pas encore bien documentés. Cependant, il existe en premier lieu, avant d'évaluer l'impact de l'un ou l'autre des ces paramètres d'aléas, une variabilité liée au stade physiologique. En effet, selon la phase de développement à laquelle les mattes de cyanobactéries sont récoltées (période de l'année), la production toxinique peut être variable. De même, il peut exister une variabilité de stade de développement au sein même d'un tapis cyanobactérien. Schématiquement, se développant de manière à priori excentrique, les populations extérieures à la matte seraient plus jeunes et il y aurait donc un gradient de production toxinique de l'extérieur vers l'intérieur. Il serait intéressant d'évaluer cette hypothèse à travers une méthodologie de prélèvement adéquate.

Approche moléculaire pour l'analyse des cyanobactéries et la prévention du risque.

Chaque échantillon de cyanobactérie collecté à Lifou a été conditionné en vue de leur analyse moléculaire à l'Institut Pasteur de Paris dans l'Unité des Cyanobactéries. Après détermination du morphotype de chaque échantillon par observation microscopique, l'approche moléculaire a pour objectif i) de caractériser la diversité génétique inter-spécifique (locus ARNr 16S) et intra-spécifique (région ITS) des mattes de cyanobactéries et ii) d'évaluer leur potentiel toxique par amplification de régions géniques codant pour des cyanotoxines connues.

Jusqu'à présent, nos essais de mises en culture sur les échantillons de Lifou n'ont pas été couronnés de succès. Les clusters de gènes associés à la synthèse de 5 cyanotoxines connues ont été recherchés. Seule la présence des gènes d'une saxitoxine a été détectée dans certains échantillons.

La présence de cyanobactéries n'implique pas nécessairement une toxicité ; afin de discriminer une souche toxinogène d'une autre ne présentant aucun risque, l'outil moléculaire est une solution d'avenir pour les programmes visant à la gestion du risque. La connaissance des voies de biosynthèse des cyanotoxines permettrait de cibler des métabolites ou des enzymes spécifiques. Ainsi, par exemple, il a été mis en évidence l'implication d'enzymes remarquables comme les PolyKétide Synthases (PKs) dans la biosynthèse de nombreux métabolites de cyanobactéries. La détection des gènes codant pour ces PKs dans les échantillons de Hunête permettrait d'investiger plus avant sur le potentiel toxique des souches présentes à Lifou.

Toxicité liée aux efflorescences de *Trichodesmium*

Lors de deux missions en saison chaude (novembre 2008 et 2009), nous avons pu récolter en grande quantité des efflorescences de *Trichodesmium* dans la zone. Les analyses ont

révélé la même forme de toxicité que les cyanobactéries benthiques. Une étude plus complète menée sur cette cyanobactérie pélagique est présentée dans la partie suivante. En ce qui concerne, le cas de toxicité à Lifou, nous pouvons nous poser la question également du lien existant entre la toxicité de *Trichodesmium* (complexe toxinique) et les contaminations des bénitiers et des poissons.

Il est fréquent que dans la zone de pêche de Hunëte, exposée aux alizés, des efflorescences de *Trichodesmium* soient observées (observations personnelles et des populations de Lifou). Ces efflorescences viennent se concentrer contre la côte et les toxines sont relarguées progressivement dans l'environnement. Il est donc possible que les populations de bénitiers puissent concentrer les toxines à l'état libre dans l'eau contribuant à leur contamination. En tout état de cause, ce phénomène d'efflorescence naturel n'est pas nouveau, il est observé par les populations locales depuis des années. Aussi, même si *Trichodesmium* contribue à la contamination des bénitiers et poissons, ces efflorescences ne peuvent expliquer à elles seules le phénomène de type ciguatérique de la zone d'étude. Ces mêmes efflorescences sont présentes tout le long de la côte de la baie de Santal, or toute la zone littorale n'est pas ciguatérique.

Présence d'holothuries : rôle fonctionnel de régénération d'un écosystème ?

Une population relativement importante de l'holothurie *Stichopus chloronotus* (Brandt, 1835) est relevée dans la ZNT depuis le début de l'étude (photo 72). Cet invertébré est absent dans la ZT jusqu'en fin 2008, où il fait progressivement réapparition.

Stichopus chloronotus (Ordre des Aspidochirota) est une holothurie fréquente dans les eaux récifales de la zone sud du Pacifique. Présente dès la zone de surface, à faible profondeur, elle vit le plus souvent sur fond dur au niveau des platiers de récif. Ce détritivore d'environ 30 cm peut ingérer de grandes quantités de sédiments avec un transit de 2 à 36 h pour un taux d'assimilation de 50% de la matière organique. Il constitue ainsi dans sa niche écologique marine l'équivalent du ver terrestre.



Photos 72 : *Stichopus chloronotus* présent en grande quantité dans la ZNT de Hunëte pendant toute la période d'étude.

D'après nos observations sur la zone d'étude à Hunëtë, ces détritivores sont présents en ZNT où la présence de tapis de cyanobactéries est faible. Tandis qu'en ZT, la présence de grandes quantités de tapis cyanobactériens s'accompagne de l'absence de *S. chloronotus* jusqu'à ce que la ZT regagne progressivement en diversité et se régénère. Il est plausible d'imaginer que ce détritivore puisse ingérer des filaments cyanobactériens mélangés au substrat sableux. Notre hypothèse est que cet organisme pourrait permettre une détoxicification voire une régénération d'une zone dégradée grâce à son fort potentiel d'ingestion du sédiment et de la matière organique associée. Les holothuries sont les organismes détritivores les plus importants de la faune récifale et possèdent un rôle fonctionnel majeur dans cet écosystème. D'après la littérature qui reste pauvre sur le sujet, le tégument des holothuries pourrait contenir des toxines appelées holothurines, forme de protection que certaines espèces auraient développé (Halstead, 1965 ; Conand, 1989).

Une étude de ces organismes pourrait permettre de savoir s'ils accumulent les toxines produites par les cyanobactéries ou s'ils ingèrent les filaments cyanobactériens agissant par là même comme des destructeurs des organismes progéniteurs de toxines.

Relation environnement et actions anthropiques

La ZT a fortement été endommagée dès 1999 à l'occasion de la mise en place de la rampe de mise à l'eau dans la tribu d'Hunëtë ; elle a ensuite été régulièrement soumise à différentes pressions : cyclone (2003), pluies diluvienues et tempêtes cycloniques (2005 et 2008). Par la suite, les premiers cas d'intoxications sévères seraient apparus dans la zone en 2001. Sans pouvoir conclure de manière formelle, il semble donc qu'il y ait un lien entre la dégradation massive des coraux et la contamination progressive des poissons inféodés à la zone agressée. Ainsi, le délai serait de deux ans entre les premières dégradations et l'apparition des premiers poissons contaminés.

Dans le cas de notre site d'étude, le fait que la ZT ait été la cible de pressions successives, qui plus est, aggravées par l'apparition de populations cyanobactériennes qui contribuent fortement à maintenir l'écosystème dans un état dégradé, expliquerait pourquoi ce site peine à retrouver une situation d'équilibre caractérisée par la réapparition de coraux et une diversité au niveau de la faune, bien visible dans la ZNT.

Facteurs favorisant le développement des mattes de cyanobactéries

Les cyanobactéries benthiques sont présentes à l'état naturel dans les zones récifales. Dans une zone dite saine, elles vont être retrouvées de manière très localisée et avec une relative diversité ; à l'inverse, leur prolifération en masse va engendrer un déséquilibre dans l'écosystème. Nous avons pu voir en introduction quelques exemples de facteurs favorisants ces situations d'efflorescence (apport en sels nutritifs ou facteurs abiotiques : température, salinité, ensoleillement...).

Voici une proposition de schéma des conditions favorables à l'entretien des tapis cyanobactériens :

Les cyanobactéries sont susceptibles de se développer en masse lorsqu'est mis à leur disposition un substrat propice où les phénomènes de compétition pour l'espace sont moindres (e.g. mort des coraux, s'accompagnant d'une diminution des substances mucilagineuses qui, en temps normal empêchent la fixation des filaments cyanobactériens). Par la suite, cette prolifération est régulièrement entretenue grâce au maintien de substrats vierges à la suite de dégradations répétées, en association avec de faibles pressions extérieures (absence de prédateurs, compétition pour la lumière...), des apports terrigènes, etc.... (Sprachta *et al.*, 2001).

Ainsi, globalement, depuis une vingtaine d'années, les proliférations de cyanobactéries sont favorisées par des facteurs d'origine naturelle ou anthropique. Ces développements en masse sont néfastes pour les structures corallienes et algales. Les modifications climatiques provoquant le blanchiment corallien peuvent aussi constituer un facteur indirect favorisant le développement des communautés cyanobactériennes (Sprachta *et al.*, 2001 ; Frémy et Lassus, 2001 ; Humbert, 2001).

II.4.c Comparaison avec les sites d'études du Vanuatu et de Raivavae

Des cas d'intoxications similaires associés à ce phénomène écotoxicologique particulier impliquant des cyanobactéries benthiques et des bénitiers, ont également été rapportés dans certaines îles de Polynésie Française comme à Bora Bora (Archipel de la Société), à Fangatau et à Pukarua (Tuamotu) (Bagnis, 1967 ; Laurent *et al.*, 2008) sans qu'aucune étude n'ait pu élucider l'origine du phénomène.

Ainsi, deux autres sites identifiés au Vanuatu et dans l'archipel des Australes en Polynésie française et présentant les mêmes problèmes d'intoxications que ceux observés à Lifou sont actuellement à l'étude.

II.4.c.1 L'île d'Emao au Vanuatu

En novembre 2008, au cours du colloque « Ciguatéra et Biotoxines Associées » organisé conjointement par l'IRD, l'IPNC, l'ILM et la CPS à Nouméa, un représentant du service des pêches du Vanuatu a attiré l'attention de l'assistance sur de sévères intoxications dans l'île d'Emao, à proximité d'Efaté (figure 50). Alors que six villages composent l'île d'Emao, le village de Lausake (situé sur la côte sud-est) était le seul touché par la flambée toxique. Les habitants tombaient gravement malades à la suite de la consommation de poissons et de bénitiers pêchés dans le lagon, avec des symptômes de type ciguatérique.

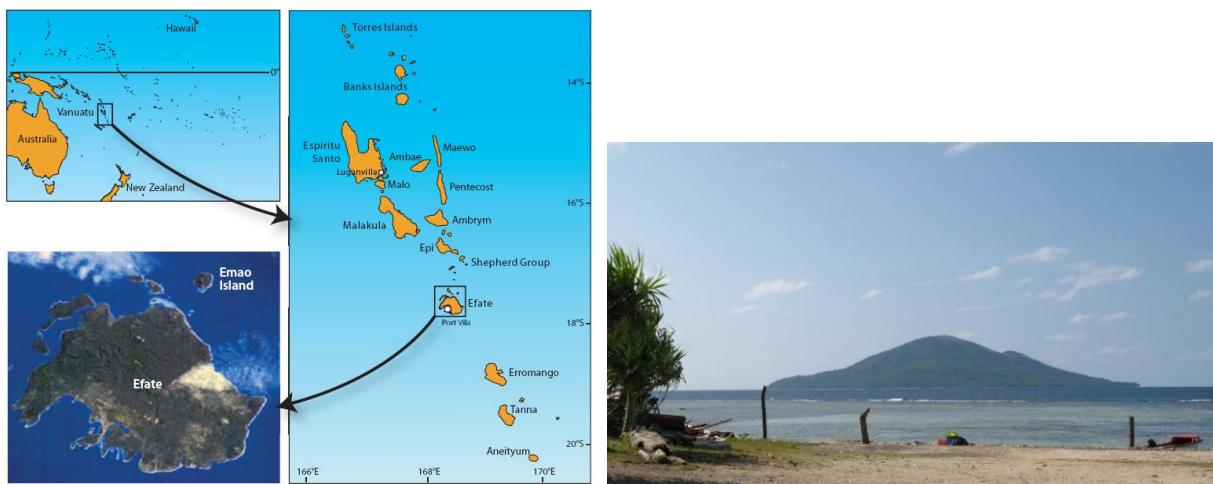


Figure 50: Localisation et vue de l'île d'Emao, Vanuatu.

Pour aider les services sanitaires du pays et la population d'Emao à comprendre le phénomène mais également afin de le comparer à celui étudié à Lifou, notre équipe y a mené une étude écotoxicologique. Deux missions auxquelles j'ai pu participer, furent réalisées en mai et novembre 2009. La première a permis de prendre contact avec la population du village de Lausake et de s'informer sur les cas d'intoxications et l'état écologique des zones incriminées (Yeeting, 2009). La deuxième a été consacrée à l'étude écotoxicologique proprement dite du phénomène. Brièvement, voici les informations majeures et préliminaires recueillies lors de cette étude.

Informations générales

La zone contaminée semble se limiter à la zone récifale adjacente au village de Lausake, s'étendant de la plage jusqu'à la barrière récifale. Cela fait dix ans que les poissons de récif sont toxiques, mais les bénitiers, les trocas, les gastéropodes (comme *Nerita polita*), les crabes et les autres crustacés (comme *Atactodea striata*) présentent également une certaine toxicité remontant à environ trois à quatre ans. Ils peuvent pêcher uniquement hors du lagon. Seuls les poulpes peuvent être consommés.

Les cas d'intoxications déclarés à Port-Vila sont en augmentation depuis 2008 et sont pour la plupart causés par des poissons provenant d'Emao. Ceux-ci sont désormais évités au marché de Port-Vila.

Données épidémiologiques

Sur l'ensemble des personnes de la population du village de Lausake interrogées (environ 40), toutes ont été intoxiquées au moins une fois soit par les poissons, soit par les mollusques ou par les 2. Les villageois disent souffrir de symptômes distincts selon qu'ils ingèrent du poisson毒ique ou des crustacés toxiques. Le tableau clinique associé à la consommation de poisson毒ique est typique de la ciguatéra : fatigue intense, nausées,

diarrhées, douleurs articulaires et inversion des sensations de chaud et de froid. Les symptômes provoqués par l'ingestion de crustacés surgissent rapidement : picotement des lèvres et sensations de brûlure dans la bouche, suivis de problèmes gastro-intestinaux (diarrhée et vomissements) au cours de la première heure suivant l'ingestion, et de symptômes neurologiques qui perdurent plusieurs semaines (tandis qu'ils persistent pendant plusieurs mois avec la ciguatera).

Données écologiques

La zone récifale contaminée couvre environ 1 000 m de la plage au récif-barrière. Elle se compose principalement d'*Acropora* spp., dont la plupart étaient morts ou très fragilisés et recouverts de tapis de cyanobactéries filamenteuses (photos 73 et 74). Ces cyanobactéries sont majoritairement de l'ordre des Oscillariales mais aussi de l'ordre des Nostocales (*Hydrocoleum*, *Lyngbya* et *Anabaena*), et forment de vastes ou de petits tapis de formes diverses selon les espèces.



73



74

Photos 73 et 74: *Acropora* spp. dégradés dans la zone dite toxique et présence de grandes mattes cyanobactériennes du genre *Anabaena*.

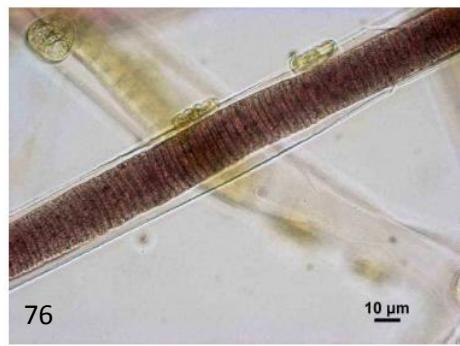
Les prélèvements de macro-algues pour vérifier la présence ou non de dinoflagellés ciguatoxinogènes dans la zone incriminée indiquent l'absence de dinoflagellés du genre *Gambierdiscus*.

En outre, à une distance de 10 - 20 m de la plage et le long celle-ci, sur une bande d'environ 100 m, on a observé des jardins de coraux mous du genre *Sinularia*. Les eaux côtières étaient très turbides, en particulier à 50 m du rivage.

Premiers éléments toxicologiques.

Les espèces de cyanobactéries dominant la zone ont été prélevées en quantité suffisante pour l'analyse de leur toxicité selon la même méthodologie que celle employée à Lifou ; il s'agit entre autre d'*Anabaena* spp (photo 74), *Hydrocoleum glutinosum* et *Lyngbya sordida* (photos 75 et 76). Pour cette dernière, les résultats indiquent i) une toxicité similaire aux Oscillariales de

Lifou, qui inclue des symptômes de type paralysant observés sur souris ($DL_{50} \approx 3$ à 4 mg d'extrait / g de souris) et ii) une activité cytotoxique non spécifique des CSSP ($p = 0,936$) (test N2A) ($CI_{50} = 99,8 \pm 21,5$ meg eqv d'extrait / mL). Les *Lyngbya sordida* d'Emao montrent donc le même type de toxicité que leurs « cousins » analysées à Lifou.



Photos 75 et 76: Tapis cyanobactériens dominés par *Lyngbya sordida* *in natura* (75) et vue microscopique (76).

Des analyses toxicologiques réalisées sur des bénitiers (*Hippopus hippopus*) collectés dans la zone de Lausake ont mis en évidence le même type de toxicité que les bénitiers contaminés à Lifou : toxicité de type paralysante (test souris) et cytotoxicité non spécifique des CSSP (test N2A).



Photos 77, 78 et 79 : Espèces de poissons collectées lors de la première mission à Emao et déclarées fortement à risque par la population : *Lethrinus harak*, *Hipposcarus longiceps* et *Ctenochaetus striatus*.

Enfin, en ce qui concerne les poissons, trois spécimens appartenant aux 3 espèces déclarées comme les plus à risque par la population (photos 77, 78 et 79) ont été analysés selon la méthodologie utilisée à Lifou (protocole d'extraction rapide suivi du test N2A). Les résultats préliminaires ont montré une forte toxicité pour ces trois espèces, *Ctenochaetus striatus* s'avérant plus毒ique que *Lethrinus harak* et *Hipposcarus longiceps*.

Conclusions

Les analyses du matériel biologique collecté en novembre 2009 (6 échantillons de cyanobactéries, 18 bénitiers et 53 poissons) sont en cours d'analyse. Cependant, les premières données toxicologiques laissent entrevoir de fortes similitudes entre le phénomène d'intoxication qui sévit à Emao et celui auquel la population d'Hunëtë est confrontée.

Les fortes dégradations observées de l'écosystème lagunaire, la présence en masse des cyanobactéries, la contamination de vecteurs (bénitier et poisson de bas niveau trophique) avec la présence d'un complexe toxinique (substances hydrosolubles paralysantes et substances liposolubles cytotoxiques) associée aux premières données épidémiologiques sont des éléments en faveur du nouveau schéma ciguatérique que nous proposons : le *Ciguatera Shellfish Poisoning*.

II.4.c.2 L'île de Raivavae en Polynésie Française

D'autres cas d'intoxications liées à l'ingestion de chair de bénitiers ont été signalés à Raivavae (Australes, Polynésie française). Dans cet île, où de nombreuses perturbations anthropiques ont pu être observées, sévit également des cas d'intoxications ciguatériques classiques causées par l'ingestion de poissons (Chinain *et al.*, 2010a). L'intoxication par les bénitiers y fait actuellement l'objet d'une étude toxicologique similaire à celle menée à Lifou.

En particulier à Raivavae, la présence en masse d'*Oscillatoria* est observée dans des zones ayant subi de fortes pressions anthropiques. Leur criblage toxicologique a pu mettre en évidence une activité de type paralysante des composés hydrosolubles (test souris, $DL_{50} \approx 1$ mg d'extrait / g de souris) associée à une activité毒ique spécifique des CSSP (test RBA, fraction liposoluble purifiée : 1,14 µg eqv de PCTX-3C / g d'extrait et test N2A, $CI_{50} = 7,1$ µg d'extrait / mL). En outre, les bénitiers de la ZT ont révélé une forte toxicité de type paralysante (test souris, Tox ++, $DL_{50} \approx 5 - 7,5$ mg d'extrait / g de souris) et spécifique des CSSP (test RBA, fraction liposoluble purifiée, 60 ng eqv. P-CTX-3C par g de chair).

Les résultats de cette étude font l'objet d'une publication en cours de rédaction :

Giant clam poisoning: a new ecotoxicological phenomenon related to marine benthic Oscillatoriales (cyanobacteria) blooms. Laurent D., Kerbrat A.S., Rosssi F., Darius H.T., Haddad M., Golubic S., Pauillac S., Chinain M., en préparation.

II.4.d Etablissement d'un nouveau schéma de transmission

L'ensemble des données épidémiologiques, environnementales et écotoxicologiques obtenu à Lifou, également appuyé par les données en provenance d'Emao et de Raivavae, est en faveur d'un phénomène plus complexe que la ciguatera classique.

Ce schéma implique à la fois des toxines liposolubles de type CTXs et des toxines hydrosolubles de type AnTXs ou STXs. Ainsi, à la lumière de ces données récentes, il nous paraît souhaitable de reprendre le schéma de transmission des neurotoxines impliquées dans les intoxications ciguatériques classiques ou « Ciguatera Fish Poisoning » rappelé dans le chapitre 1 (cf. ch1.II.7.c), en le modifiant. Un nouveau schéma est proposé, que nous désignerons sous l'appellation de « Ciguatera Shellfish Poisoning » (figure 51).

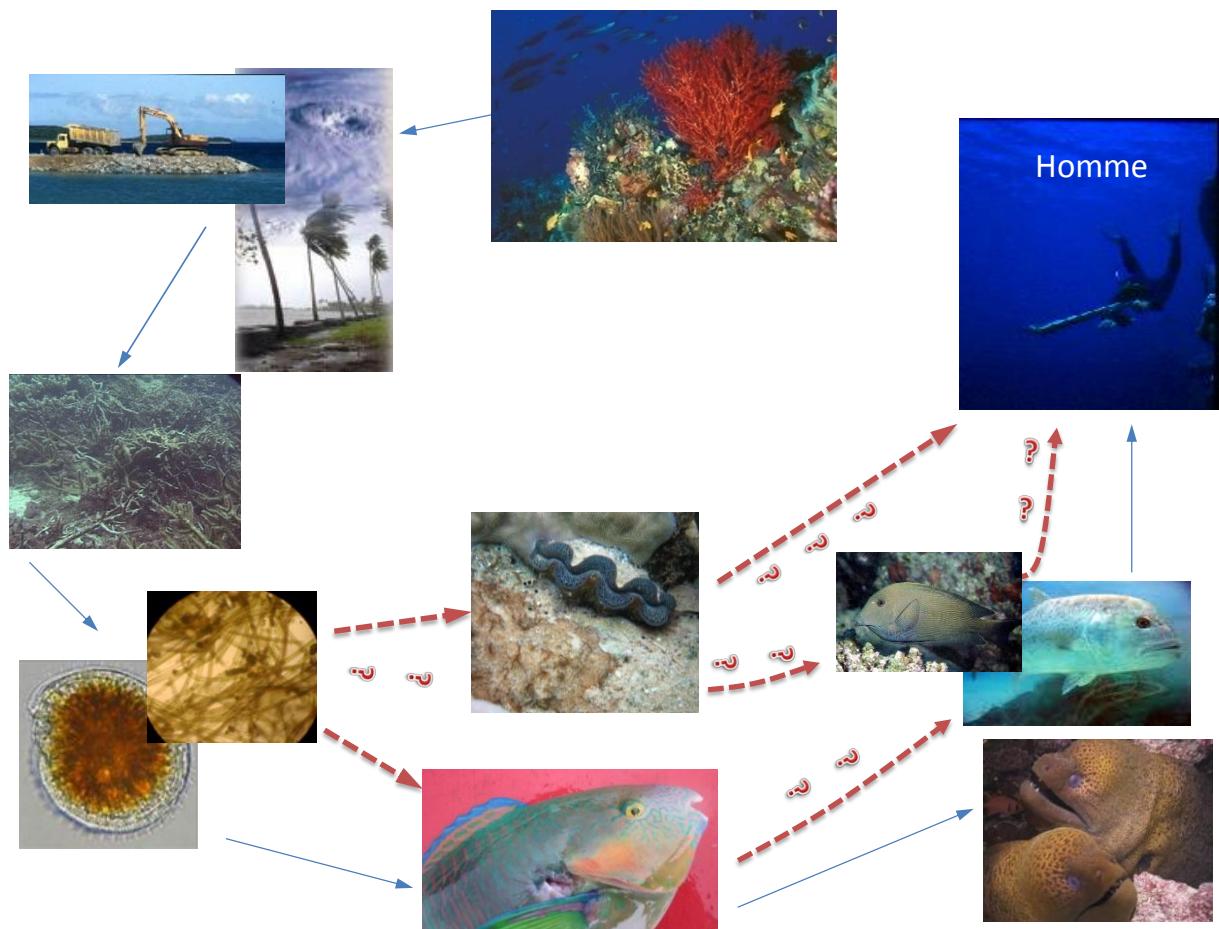


Figure 51: Proposition d'une nouvelle voie de bioaccumulation des biotoxines de la chaîne trophique de la ciguatera impliquant les cyanobactéries et les bénitiers, ou « *Ciguatera Shellfish Poisoning* ».

Cette voie de bioaccumulation permettrait de comprendre le profil inédit de certaines intoxications par organismes marins survenues dans le passé, comme c'est le cas à Hunëtë ou à Bora Bora en 1967 (Bagnis, 1967).

Associées aux *Gambierdiscus* dont le rôle dans la biogénèse de la ciguatera est formellement établi, les **cyanobactéries** de l'ordre des Oscillatoriiales sont productrices d'un complexe toxinique. Les voies de transfert de ces toxines impliquent de nouveaux vecteurs comme les mollusques bivalves ou gatéropodes (bénitier, trocha, ...) et contaminent certains poissons de bas étage trophique (comme les perroquets ou les chirurgiens). Ceci est cohérent avec les données épidémiologiques de Lifou où la majorité des cas sévères résulte de l'ingestion de perroquets, et pour certains des patients, de bénitiers.

Les voies de transfert des cyanotoxines vers le réseau trophique ne sont pas encore bien connues. Le mode d'intégration de ces toxines dans la chaîne alimentaire via les herbivores pourrait se faire par broutage lors de la consommation directe des filaments cyanobactériens benthiques. Cependant, les cyanobactéries ne faisant pas partie de l'alimentation de base de cette catégorie d'herbivores, elles pourraient constituer une source de nourriture par défaut.

Par ailleurs, les principaux prédateurs des cyanobactéries sont constitués du zooplancton herbivore (ex. : copépodes) ou des organismes comme les limaces de mer (mollusques opistobranches) qui ont la capacité de détoxifier les métabolites secondaires (Capper *et al.*, 2006 ; Capper and Paul, 2008). Ces crustacés et ces mollusques pourraient donc constituer un maillon intermédiaire entre les cyanobactéries et les poissons molluscivores.

Outre l'ingestion des cellules cyanobactériennes par des herbivores, une autre voie possible d'intégration des toxines dans le réseau trophique pourrait s'opérer via l'accumulation directe des toxines libres dans l'eau (Humbert *et al.*, 2001). Si les effets des cyanotoxines sur le métabolisme sont de plus en plus documentés, ceux concernant le mode de transfert des cyanotoxines dans le réseau trophique restent encore mal connus tant il est complexe.

Enfin, il est intéressant de rappeler que l'origine du mot ciguatéra vient du nom espagnol du turbo à l'origine de fortes intoxications à Cuba, et dont les symptômes majoritaires sont typiques des intoxications paralysantes (brûlure de la bouche et de la gorge) (cf. ch1.II.2).

II.5 Conclusion

Sur le site de Lifou, nous avons pu mettre en évidence une relation entre une action anthropique, la présence de cyanobactéries du groupe des Oscillatoriales, une flambée de ciguatéra classique et des empoisonnements concomitants par des bénitiers. Les bénitiers comme les cyanobactéries se sont avérés toxiques avec la présence d'un complexe toxinique d'activité CTX-like et paralysante. A Lifou, comme ce qui a été observé à Emao et à Raivavae, les analyses toxicologiques des poissons ont montré que ce sont des espèces de début de chaîne alimentaire qui semblent plus particulièrement impliquées, ainsi que certains mollusques comme les bénitiers. Ces données sont à relier avec les observations rapportées en 1955, dans l'atoll de Palmyra, où l'apparition de poissons ciguatériques concernait plus particulièrement les espèces consommatrices de cyanobactéries (Dawson *et al.*, 1955). La relation entre l'émergence de ciguatéra dans des zones caractérisées par le développement intensif de populations cyanobactériennes et des phénomènes d'intoxications par bénitiers avait déjà été suggérée précédemment (Bagnis, 1967 ; Banner, 1967).

Les populations de *Trichodesmium* spp. ont été dans le passé fortement suspectées dans la contamination des poissons ciguatériques (Endean *et al.*, 1992). Egalement présente à Lifou, *Trichodesmium* spp. est un genre très communément rencontré dans les eaux calédoniennes. Il nous paraît donc essentiel d'évaluer le risque que peuvent encourir les populations vis-à-vis des développements saisonniers de cette cyanobactérie pélagique, et de préciser leur rôle potentiel dans ce nouveau phénomène que représente le « *Ciguatera Shellfish Poisoning* ».

III. Etude de la toxicité de *Trichodesmium* sp.

III.1 Introduction

III.1.a *Trichodesmium* : une Oscillatoriales pélagique

Les aviateurs survolant les zones tropicales peuvent apercevoir de longues traînées rougeâtres à blanchâtres qui parsèment les eaux du lagon ou du large ; les navigateurs les surnomment les « sea sawdust » (traduire littéralement par *sciure de mer*). Les images satellites révèlent des mattes pouvant atteindre près de 90 000 km² entre la Nouvelle Calédonie, les archipels du Vanuatu, de Fidji et de Tonga (Dupouy, 1992 ; Dupouy *et al.*, 2010). Ces tâches sont constituées de cyanobactéries pélagiques du genre *Trichodesmium* (Oscillatoriales). Organisme microscopique, il est visible à l'œil nu durant ces phases d'efflorescence (Photo 80).



Photo 80 : (a) et (b) Efflorescences de *Trichodesmium erythraeum* à Lifou (Île Loyauté).

Selon la nomenclature botanique, huit espèces marines ont été décrites à ce jour, et deux d'eau douce (Carpenter *et al.*, 1993 ; Janson *et al.*, 1995 ; Janson *et al.*, 1999). *T. erythraeum* (Ehrenberg ex Gomont 1892) et *T. thiebautii* (Gomont ex Gomont 1892) sont les espèces les plus fréquemment rencontrées dans les eaux calédoniennes (Rodier and Le Borgne, 2008 ; 2010).

Durant l'été austral (de septembre à mars), les *Trichodesmium* sont capables de former d'importantes efflorescences. Plus exactement, c'est au moment de la phase de sénescence, alors que les pigments photosynthétiques sont relargués, que les mattes de *Trichodesmium* sont visibles en surface. Les conditions favorables à ce développement soudain et massif ne sont pas encore bien caractérisées mais certains facteurs physico-chimiques apparaissent être nécessaires (Bhat *et al.* ; 2006; Tenório *et al.* ; 2005; Rodier and Le Borgne, 2008 ; 2010) :

- Une température supérieure à 26°C,
- La stratification de la masse d'eau par densité (mer calme),
- Des eaux très pauvres en sels nutritifs,
- Des teneurs spécifiques en phosphore et en fer.

III.1.b Mise en évidence de la toxicité

Peu d'auteurs se sont penchés sur le potentiel toxique de *Trichodesmium* alors que de nombreuses études traitant de l'aspect écologique existent (Sellner, 1997). Ce manque de connaissances peut être expliqué par le côté aléatoire des efflorescences et les difficultés de mise en culture (Chen *et al.*, 1996 ; Bell *et al.*, 2005). Les conséquences de ces proliférations sur le milieu sont peu connues et sont d'ordre écologique, économique et sanitaire. Les communautés phytoplanctoniques dominées par *Trichodesmium* peuvent être affectées par le potentiel toxique de ces cyanobactéries, notamment le zooplancton, un de leurs prédateurs naturel.

Comme nous l'avons présenté dans le chapitre 1 (cf. ch1.II.7.a.2) et en introduction de ce chapitre (cf. ch2.I.1.b), certains auteurs ont mis en évidence la présence de différents types toxiniques chez cette cyanobactérie pélagique: (i) toxines paralysantes par Hawser *et al.* (1991 et 1992) et (ii) toxines de type CTXs par Hahn and Capra (1992) et Endean *et al.* (1993). Cette toxicité a également été tenue pour responsable de problèmes de développement de crevettes en milieu naturel, dans le Golfe de Carpentaria en Australie du Nord (Preston *et al.* 1998). Toutefois, hormis des irritations cutanées et oculaires décrites chez des personnes nageant dans les mottes de *Trichodesmium* qui se concentrent en bord de sites récréatifs (Sato *et al.*, 1963 ; communications personnelles), aucun effet délétère par ingestion n'a encore été rapportée chez l'Homme, vraisemblablement faute d'observations permettant de les différencier de ceux provoqués par les dinoflagellés. Leur toxicité reste donc à être caractérisée, et leur lien avec la ciguatera à prouver.

Récemment, Ramos *et al.* (2005) ont montré par analyse chromatographique, la présence de microcystine-LR chez *T. erythraeum*. Proença *et al.* (2009) ont détecté également des traces de microcystines associées à la présence de congénères de STXs. Cependant, au vu des concentrations estimées, ces études concluaient à l'innocuité des populations analysées.

Trichodesmium est proche phylogénétiquement des Oscillarioles benthiques toxiques étudiées à Lifou (Abed *et al.*, 2006 ; Méjean *et al.*, 2009). Aussi, nous suspectons fortement le risque de la contamination de la chaîne alimentaire par les toxines produites par *Trichodesmium*, comme cela l'a déjà été suggéré.

Lors des missions menées à Lifou, nous avons pu à deux reprises collecter en quantité *Trichodesmium*. En novembre 2008 et 2009 (L14 et L17), d'importantes mottes cyanobactériennes de surface ont été observées dans la zone de pêche à l'origine de sévères intoxications de type ciguaterique.

Les populations de *Trichodesmium* pourraient-elles avoir un lien avec la contamination des poissons et des bénitiers pêchés dans cette zone ? A travers cette étude, nous souhaitions confirmer la toxicité de *Trichodesmium* et le cas échéant, caractériser le type toxinique en jeu. Les efflorescences de cette cyanobactérie pélagique étant fréquentes en saison chaude dans les

eaux calédoniennes, nous avons vu là l'opportunité de disposer de matériel biologique suffisant pour répondre à cette problématique.

L'ensemble des résultats de cette étude a fait l'objet d'une publication dans la revue *Marine Pollution Bulletin*, et d'un article en cours de rédaction, mettant respectivement en évidence un complexe toxinique et la présence de palytoxine chez *Trichodesmium* :

Article 2 : *Kerbrat A.S., Darius H.T., Pauillac S., Chinain M., Laurent D., 2010. Detection of ciguatoxin-like and paralysing toxins in Trichodesmium spp. from New Caledonia lagoon. Special issue, Marine Pollution Bulletin –Article, DOI : 10.1016/j.marpolbul.2010.06.017.*

Article 3 : *Kerbrat A.S., Amzil Z., Pawlowiez R., Golubic S., Sibat M., Chinain M., Laurent D. First evidence of palytoxin in Trichodesmium cyanobacteria: Possible implication in clupeotoxism. En préparation.*

III.2 Matériels et méthodes

III.2.a Site d'étude et méthode de collecte

Les échantillons de *Trichodesmium* sont récoltés durant l'été austral, période pendant laquelle la fréquence des efflorescences est la plus importante (photos 81 et 82). Ces cyanobactéries pélagiques sont collectées en sub-surface (0 - 1 m) à l'aide d'un filet à plancton de 35 µm de maille ou à l'aide de l'aspirateur sous-marin utilisé pour la collecte des cyanobactéries benthiques. Chaque collecte se fait délicatement pour éviter le relargage du contenu cellulaire et notamment des toxines. En effet, les trichomes en phase finale d'efflorescence venant se désagréger en surface sont particulièrement fragiles.

Lors des collectes de masse, les propriétés de flottabilité des trichomes de *Trichodesmium* dues aux vacuoles et/ou lipides sont utilisées pour concentrer le matériel biologique : les mattes sont rassemblées dans des flacons d'1 L qui, bouchon fermé, sont ensuite retournés pour permettre une concentration en surface des trichomes (photo 83). L'eau de mer est alors régulièrement évacuée. Chaque spécimen est aliquoté et fixé dans une solution de 5% de formaldéhyde en eau de mer filtrée à 0,45 µm pour l'identification morphologique. Les mattes de cyanobactéries concentrées dans les flacons de collecte sont alors congelées puis lyophilisées avant extraction.



Photos 81, 82 et 83: Vues d'une efflorescence de *Trichodesmium* atteignant la surface dans la Baie de Santal à Lifou et se concentrant sur la rive (81, 82) ; technique de récolte utilisant la flottabilité des trichomes pour se concentrer en surface (83).

III.2.b Extraction et analyses toxicologiques

Les échantillons de *Trichodesmium* sont traités et analysés selon la méthodologie utilisée à Lifou et décrite précédemment (cf. ch.2.II.2). Brièvement, après extraction méthanolique des extraits lyophilisés, les composés hydrosolubles et liposolubles sont séparés par extraction liquide-liquide.

Dans un premier temps, les analyses toxiniques sont menées sur les extraits hydrosolubles (test souris) et les extraits liposolubles (test souris et N2A) (cf. ch2.II.2.d). Puis, les extraits hydrosolubles qui ont manifesté des résultats positifs de toxicité, sont analysés en LC-MS/MS, tandis que les extraits liposolubles sont purifiés par chromatographie en phase inverse et les fractions recueillies analysées par test N2A et RBA (cf. ch2.II.2.d).

III.2.c Analyses chromatographiques des extraits hydrosolubles

Les analyses chromatographiques présentées dans cette partie ont été réalisées au laboratoire des phycotoxines de l'IFREMER à Nantes, sous la responsabilité de Zouher Amzil.

Elles visent à détecter, dans les extraits hydrosolubles de *Trichodesmium*, la présence de différentes toxines proches de la palytoxine :

- PTX, isolée de *Palythoa* spp. et d'*Ostreopsis* spp.,
- 42 - OH PTX: analogue de la PTX récemment isolé d'un corail mou (*Palythoa*),
- Ovatoxine - A : analogue de la PTX isolé d'*Ostreopsis* cf. *ovata*,
- Ostreocine - D : analogue de la PTX isolé de *O. siamensis*,
- Mascarenotoxines A et B : analogues de la PTX isolé de *O. mascarensis*.

Les analyses LC-MS/MS sont conduites sur la fraction hydrosoluble diluée dans du méthanol aqueux à 80%. Des aliquots de 300 µL sont filtrés (0,2 µm whatman® vectaspin filtration) puis 5 µL du filtrat sont injectés pour analyse.

Les analyses sont menées selon la méthode décrite par Ciminiello *et al.* (2006) avec un système de chromatographie liquide (HP 1 200, Agilent) couplée à un spectromètre de masse

hybride triple-quadrupole à trappe d'ions (API-4 000Qtrap, PE/SCIEX) équipé d'une interface turbo spray®. Une colonne C18 Gemini de 5 µm (150*2.0 mm, Phenomenex) est utilisée à 20°C et à 200 µL / mn. Les éluants sont l'H₂O (A) et un mélange d'acétonitrile / H₂O à 95%, A et B contiennent 2 mM de formiate d'ammonium et 50 mM d'acide formique. Le gradient de B augmente de 20 à 100% en 10 mn, maintenu durant 4 mn avant de revenir aux conditions initiales. Le contrôle de l'appareillage, du traitement des données et de l'analyse est géré par le logiciel Analyst.

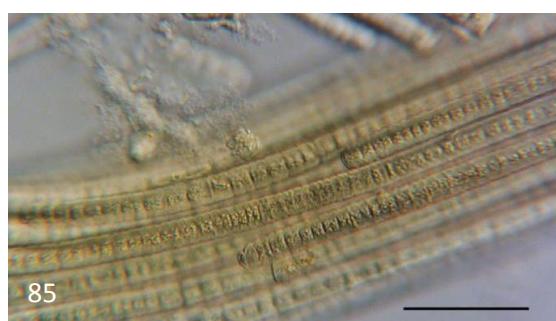
Le système de détection du spectromètre (en mode positif) est optimisé grâce à une solution standard de PTX avec utilisation du Multiple Reaction Monitoring (MRM). L'énergie de collision émise est de 45 eV pour les ions bi-chargés [M+2H]²⁺, [M+2H-H₂O]²⁺ et de 33 eV pour les ions tri-chargés [M+3H]³⁺, pour l'ionisation du produit caractéristique à 327. Les transitions sont les suivantes : m/z 1 340, 1 332, 1 324, 1 315, 896, 327 pour la PTX ; m/z 889, 327 pour l'ovatoxine-a et m/z 1 348.7, 1 339.7, 899.7, 327 pour la 42-OH PTX.

III.3 Résultats

III.3.a Récolte et Identification morphologique

Les échantillons récoltés lors des différentes efflorescences sont listés en tableau 37 en spécifiant la date, le lieu, ainsi que l'espèce constituant majoritairement la matte cyanobactérienne ; les masses des fractions obtenues sont également indiquées.

Deux espèces ont été formellement identifiées sur la base de critères morphologiques, *T. erythraeum* et *T. thiebautii*. Les trichomes de *T. erythraeum* (Ehrenberg ex Gomont, 1892) sont typiquement arrangés en parallèle pour constituer les nombreux fagots caractéristiques des efflorescences de cette espèce (Photo 84). La population échantillonnée en novembre 2009 (L17) est constituée de trichomes de 9,85 ± 0,69 µm de large (n = 20) et de cellules de 6,47 ± 1,74 µm de longueur (n = 30) (photo 85).



Photos 84, 85: Vues des trichomes arrangeés en fagots (84), et vue microscopique de *T. erythraeum* collectés à Lifou en novembre 2009 (L17) (barre d'échelle = 5 µm) (85).

Tableau 37 : Echantillons de *Trichodesmium* spp. : Numéro de référence (réf.), date, nom et site de collecte, identification de l'espèce majoritaire et rendement de l'extraction (extrait hydrosoluble et liposoluble) donné en % de matière lyophilisée (ML).

Réf.	Date	Nom	Site	Latitude	Longitude	Espèces dominantes	Extrait hydrosoluble % ML	Extrait liposoluble % ML
1a	2007/02	Tricho Ouinné 1	Baie de la Ouinné	-21,983056	166,699255	<i>T. erythraeum</i>	52,0	5,2
1b	2007/02	Tricho Ouinné 2	Baie de la Ouinné	-22,000000	166,780000	<i>T. erythraeum</i>	20,5	2,7
1c	2007/02	Tricho Ouinné 3	Baie de la Ouinné	-22,000000	166,780000	<i>T. thiebautii</i>	28,4	9,0
1d	2007/02	Tricho Ouinné 4	Baie de la Ouinné	-22,000000	166,780000	<i>T. erythraeum</i> + <i>T. thiebautii</i>	38,9	5,0
2	2007/03	Tricho 5îles	Lagon Sud Ouest « 5 îles »	-22,771900	166,800995	<i>T. erythraeum</i>	64,3	2,2
3	2007/09	Tricho BD 2007	Baie des citrons	-22,297600	166,438004	<i>T. erythraeum</i>	51,6	0,8
4	2008/02	Tricho BD 2008	Baie des citrons	-22,295700	166,436005	<i>T. erythraeum</i>	68,8	1,0
5	2008/02	Tricho Db	Passe de Dumbéa	-22,349501	166,274994	<i>T. erythraeum</i>	26,2	2,8
6	2008/02	Tricho R	Récif Ricaudy	-22,306900	166,460210	<i>T. erythraeum</i>	21,5	2,2
7	2008/11	Tricho L14	Lifou – Hunëtë	-20,767310	167,093006	<i>T. erythraeum</i>	52,5	1,1
8	2009/02	Tricho 02-2009	Passe de Dumbéa	-22,349501	166,274994	<i>T. erythraeum</i>	49,7	0,2
9	2009/11	Tricho L17 C2	Lifou - Hunëtë	-20,767310	167,093006	<i>T. erythraeum</i>	55,4	0,2

T. thiebautii a été échantillonné à une seule occasion (2 prélèvements) à l'Est de la Grande Terre au niveau de la Baie de Ouinné (n°1c et 1d). Cette espèce est le plus souvent rencontrée à l'extérieur du lagon dans des eaux plus oligotrophes (Rodier and Le Borgne, 2010). Les mattes majoritairement constituées de *T. erythraeum* ont été récoltées dans le lagon Sud Ouest et plus particulièrement en face de Nouméa, moins exposé aux alizés.

Tous les échantillons de cyanobactéries étaient majoritairement mono-spécifiques. Cependant ces mattes sont récoltées en surface où de nombreux autres organismes s'agrègent constituant les laisses des mers, visibles sur le littoral à marée basse. En observations plus fines, on peut vérifier la diversité de composition de ces mattes qui comprennent des copépodes, des diatomées mais également des bactéries ou des champignons ; les cyanobactéries restent la composante, en biomasse majeure, des prélèvements. Lors de la collecte, les mattes sont nettoyées manuellement en retirant les organismes visibles, tels les phéophycées ou les halophytes en détritus. Au laboratoire, par observation microscopique, l'absence d'efflorescence de dinoflagellés qui pourrait induire de la toxicité, est vérifiée dans les échantillons.

III.3.b Test souris

Fractions hydrosolubles

Les 4 extraits hydrosolubles de *Trichodesmium* testés se sont avérés toxiques sur souris (Tox + et Tox++, $DL_{50} \approx 0,5 - 2,5$ mg d'extrait /g de souris ; tableau 38). Les symptômes observés, très similaires à ceux des extraits de cyanobactéries benthiques récoltées à Lifou, sont de type paralysant : ils incluent une faiblesse générale, une paralysie progressive qui atteint l'ensemble du corps pouvant passer par une phase de coma transitoire ou fatale aux animaux. Cette paralysie s'accompagne de cyanoses des extrémités, de spasmes et également de difficultés respiratoires à l'origine des mortalités observées. Aucun symptôme d'hypersalivation n'est visible. Sur la base du tableau 12 qui résume les principaux symptômes observés chez les souris après injection de différentes toxines pures, l'activité toxique présente dans ces échantillons de *Trichodesmium* évoquerait donc plutôt l'action de la PTX ou de la PbTx, à la différence près qu'aucune diarrhée n'est observée.

Fractions liposolubles

Deux (2) extraits liposolubles ont été testés, leurs injections entraînent des symptômes d'affaiblissement, de perte de réactivité, de tremblements, de contractions abdominales et ponctuellement de spasmes ; une forme d'ataxie est également observée (tableau 38). Ces symptômes associés à la longue récupération qui peut durer 24 h, pourraient être assimilés aux symptômes de type ciguatérique. Cependant aucun symptôme de diarrhée ou de cyanose n'est observé.

A l'issue du test souris, aucune différence n'est visible au niveau des toxicités des populations de *T. erythraeum* collectées dans des zones géographiques distinctes.

Tableau 38 : Données de toxicités des extraits hydrosolubles et liposolubles de *Trichodesmium* spp. analysés pas le test souris : DL₅₀ estimée en mg d'extrait / g de souris, Classe de toxicité et Symptômes principaux.

Réf.	Date	Référence	Toxicité de l'extrait hydrosoluble			Toxicité de l'extrait liposoluble		
			DL ₅₀ (mg / g)	Classe	Symptômes	DL ₅₀ (mg / g)	Classe	Symptômes
1a	2007/02	<i>Tricho Quinné 1</i>	1,0 -2,0	Tox +	<i>Paralysie générale du corps, cyanose des membres, mort par paralysie respiratoire</i>	-	-	-
1d	2007/02	<i>Tricho Quinné 4</i>	-	-	-	-	Tox +	<i>Affaiblissement, perte de réactivité, tremblement, affaissement</i>
3	2007/09	<i>Tricho BD 2007</i>	0,5 - 2,5	Tox ++	<i>Paralysie générale du corps, cyanose des membres et mort par paralysie respiratoire</i>	-	-	-
7	2008/11	<i>Tricho L14</i>	1,0	Tox ++	<i>Paralysie générale, coma, mort par détresse respiratoire</i>	> 2,5	Tox+	<i>Spasmes, contractions abdominales, ataxie</i>
9	2009/11	<i>Tricho L17 C2</i>	1,0 - 3,0	Tox ++	<i>Paralysie générale, coma, mort par détresse respiratoire</i>	-	-	-

III.3.c Résultats des tests N2A et RBA

Les extraits liposolubles bruts puis les fractions F1, F2 et F3 issues du fractionnement sur cartouche sep-pak® ont été analysés à l'aide des tests N2A et RBA.

Evaluation de la toxicité des extraits liposolubles (1).

Les 9 extraits liposolubles testés ont révélé une activité cytotoxique. Les valeurs de Cl₅₀ exprimées en µg eqv d'extrait / mL pour le test N2A et RBA sont présentées dans le tableau 39. Les valeurs des Cl₅₀ pour le test N2A sont celles évaluées en condition (+OV).

Pour le **test N2A**, les valeurs de Cl₅₀ des extraits liposolubles (1) varient de 142 à 212 µg / mL. Pour les extraits n°2 et n°5, les valeurs trop faibles du coefficient de Hill associées au coefficient de corrélation évoquent un effet matriciel (pente abrupte de la courbe). Comme pour les cyanobactéries benthiques, l'étape complémentaire de purification sur sep-pak® de ces extraits liposolubles (1) s'avère nécessaire. A un même niveau d'extraction, les valeurs de Cl₅₀ calculées sont comparables aux valeurs moyennes de toxicité des extraits liposolubles des cyanobactéries benthiques (tableau 19). Ces valeurs restent néanmoins supérieures aux échantillons les plus toxiques (27 µg d'extrait / mL pour *P. laysanense* dominant les mattes en août 2006 (L7), tableau 19). Les analyses des tests N2A ne montrent pas de différence entre les

cytotoxicités obtenues en conditions -OV et +OV ($p < 0,05$), traduisant une **activité toxique non spécifique des CSSP**

Tableau 39 : Toxicités des extraits liposolubles (1) de *Trichodesmium* évaluées par des tests N2A et RBA ; ND: valeur non déterminée.

Réf.	Date	Nom	Test N2A		Test RBA
			Cl ₅₀ (+OV) µg eqv d'extrait / mL	Coefficient de Hill	Cl ₅₀ µg d'extrait / mL
1a	2007/02	<i>Tricho Ouinné 1</i>	184 ± 24		570,6 ± 105,6
1b	2007/02	<i>Tricho Ouinné 2</i>	183 ± 92	-3,3 ± 4,3	287,5 ± 13,4
1c	2007/02	<i>Tricho Ouinné 3</i>	164 ± 5	ND	997,9 ± 121,3
1d	2007/02	<i>Tricho Ouinné 4</i>	164 ± 8	-2,5 ± 1,3	309,6 ± 71,3
2	2007/03	<i>Tricho 5îles</i>	-	-4,4 ± 0,8	ND
3	2007/09	<i>Tricho BD 2007</i>	212 ± 27	-	54,9 ± 0,4
5	2008/02	<i>Tricho Db</i>	142 ± 18	-3,1 ± 1,2	ND
6	2008/02	<i>Tricho R</i>	ND	-5,5 ± 3,8	41,08 ± 9,3
7	2008/11	<i>Tricho L14</i>	-	-1,6 ± 1,3	-

Dans l'analyse des échantillons de cyanobactéries benthiques, associée à cette cytotoxicité, une toxicité spécifique des CSSP avait été mise en évidence avec le test RBA. Ainsi, avant de purifier les extraits, nous avons voulu évaluer le potentiel des extraits liposolubles à déplacer la [³H]PbTx-3 traduisant une haute affinité pour le site 5 du CSSP. Les courbes de compétition obtenues par le test RBA sont représentées en figure 52.

Les 8 extraits liposolubles testés contiennent des composés à haute affinité pour le site 5 des CSSP. Les valeurs de Cl₅₀ sont reportées dans le tableau 40 : la gamme de toxicité varie de 41 à 997 µg d'extrait / mL démontrant un potentiel toxique relativement élevé pour tous les extraits testés, plus particulièrement pour les extraits échantillonnés dans la Baie de Ouinné (1a à 1b).

L'ensemble de ces résultats est en faveur de la présence d'un complexe toxinique chez *Trichodesmium* composé à la fois de toxines lipophiles se fixant sur les CSSP (test RBA) et de composés cytotoxiques non spécifiques des CSSP (test N2A).

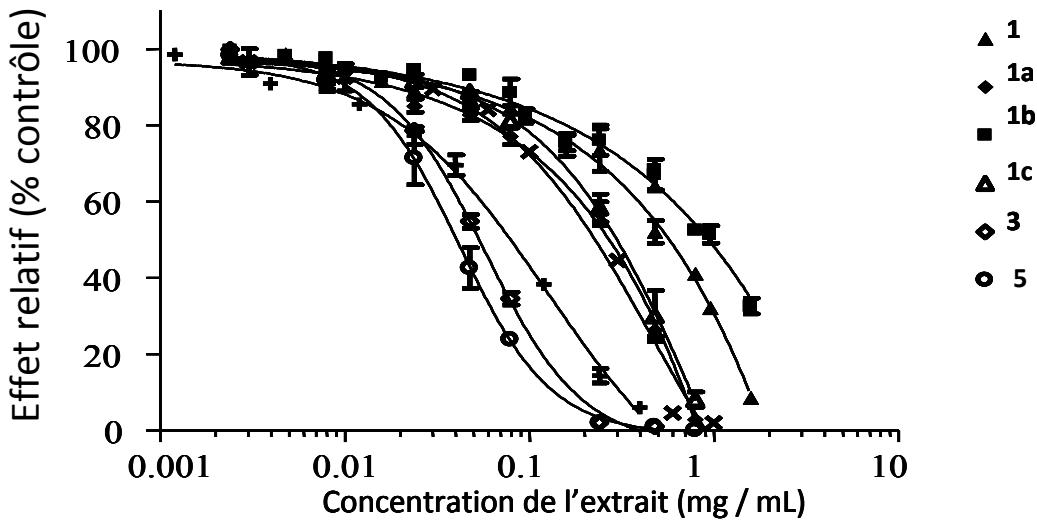


Figure 52 : Courbes de compétition obtenues au moyen du test RBA sur les extraits liposolubles de *Trichodesmium*.

Toxicité des extraits liposolubles purifiés sur Sep-pak®.

Neuf (9) extraits liposolubles (1) de *Trichodesmium* sont purifiés sur cartouche en phase inverse Sep-pak®. Les trois fractions obtenues F1, F2 et F3 sont analysées en test N2A pour évaluer leur cytotoxicité.

Aucune des fractions F1 et F3 n'a révélé d'effet cytotoxique dose-dépendant pour lequel une Cl_{50} a pu être calculée (annexe 2). Ces données indiquent que ces fractions sont atoxiques pour la gamme de concentrations testées (0 à 625 µg eqv d'extrait / mL).

Les fractions F2 (MeOH:H₂O, 90:10) sont toxiques pour l'ensemble des échantillons de *Trichodesmium* récoltés (annexe 2). Les valeurs de Cl_{50} correspondantes, déterminées en conditions -OV et +OV sont indiquées dans le tableau 40. **Excepté pour l'extrait n°8, aucune différence significative n'est observée en -OV versus +OV ($p > 0,05$)**. Ces valeurs de Cl_{50} varient de 96 à 270 µg eqv d'extrait / mL en conditions +OV, et de 45 à 192 µg eqv d'extrait / mL en conditions -OV. Elles sont du même ordre de grandeur que celles des fractions F2 des cyanobactéries benthiques de Lifou (cf. tableau 20 et figure 37) et se classent parmi les cytotoxicités moyennes (pour rappel, les échantillons les plus toxiques, *P. laysanense* et *S. weissii* (L7), avaient des valeurs de Cl_{50} de 7 µg eqv d'extrait / mL).

Seul l'extrait de *T. erythraeum* collectée à Lifou en novembre 2009 (n°9, Tricho L17 C2) ($p < 0,001$) montre une différence de cytotoxicité en conditions +OV et -OV (OV ayant une activité inhibitrice). Ceci indique que pour la majorité des extraits la cytotoxicité globale observée est **non spécifique des CSSP**. Mais comme démontrée précédemment, cette toxicité pourrait être une

résultante de composés dont les actions respectives sont antagonistes, l'un activateur et l'autre inhibiteur des CSSP.

Tableau 40 : Cytotoxicité des fractions F2 (MeOH : H₂O ; 90 : 10) d'extraits liposolubles (1) de *Trichodesmium* : valeurs des Cl₅₀ (µg eqv d'extrait / mL) et coefficients de Hill.

Réf.	Date	Nom	+OV		-OV	
			Cl ₅₀ ± SEM µg eqv d'extrait / mL	Coefficient de Hill	Cl ₅₀ ± SEM µg eqv d'extrait / mL	Coefficient de Hill
1a	2007/02	Tricho Ouinné 1	270 ± 26	ND	192 ± 26	-3,1 ± 1,1
2	2007/03	Tricho 5îles	126 ± 29	-2,8 ± 1,7	137 ± 18	-2,6 ± 0,8
3	2007/09	Tricho BD 2007	ND	ND	ND	ND
5	2008/02	Tricho Db	ND	ND	ND	ND
6	2008/02	Tricho R	ND	ND	ND	ND
7	2008/11	Tricho L14	127 ± 19	-3,1 ± 1,1	101 ± 16	-1,6 ± 0,4
8	2009/02	Tricho 02-2009	ND	ND	ND	ND
9	2009/11	Tricho L17 C2	96 ± 23	-2,6 ± 1,5	45 ± 8	-2,0 ± 0,6

L'analyse en test RBA des 2 fractions F2 purifiées sur Sep-pak® des cyanobactéries récoltées à Lifou (n°7 et 9) révèlent, là encore, la présence de composés activateurs des CSSP spécifiques du site 5 avec une activité équivalente à 5,07 et 1,65 µg de P-CTX-3C / g eqv d'extrait respectivement, démontrant une forte toxicité pour l'extrait collecté en novembre 2008 (L14).

III.3.d Analyses LC-MS/MS

Sur les 8 échantillons de *Trichodesmium* spp. (7 extraits hydrosolubles et 1 échantillon lyophilisé) analysés en HPLC-MS/MS pour la détection des toxines citées plus haut, seules la PTX et la 42-OH-PTX ont été clairement détectées chez 4 échantillons à raison de 1,08 à 1,70 µg eqv de PTX total / g d'extrait (soit 0,28 à 1,10 µg eqv de PTX total / g de cyanobactérie lyophilisée) (tableau 41 et figure 53). Pour 3 échantillons de *Trichodesmium* collectés en 2007 à Nouméa (n°3), en 2009 à la Passe de Dumbéa (n°8) et à Lifou en 2009 (n°9), aucune de ces toxines n'a été détectée (limite de détection < 0,01 µg / g).

Tableau 41 : Concentrations de PTX et son analogue en µg / g d'extrait hydrosoluble et en µg eqv de PTX / g de matériel lyophilisé dosées par analyses LC-MS/MS ; LD: Limite de détection: 0,01 µg/g ; * : analyse directement faite sur le matériel lyophilisé (ML).

Réf.	Date	Nom	PTX	42-OH-PTX	Total PTX eqv.	
			µg / g d'extrait		µg / g d'extrait	µg / g eqv. de ML
2	2007/03	Tricho 5îles	0,82	0,87	1,70	1,10
3	2007/09	Tricho BD 2007	<LD	<LD	<LD	<LD
5	2008/02	Tricho Db	0,57	0,52	1,08	0,28
6	2008/02	Tricho R	0,89	0,64	1,53	0,33
7	2008/11	Tricho L14	0,86	0,59	1,45	0,76
8	2009/02	Tricho 02-2009	<LD	<LD	<LD	<LD
9	2009/11	Tricho L17 C2*	<LD	<LD	<LD	<LD

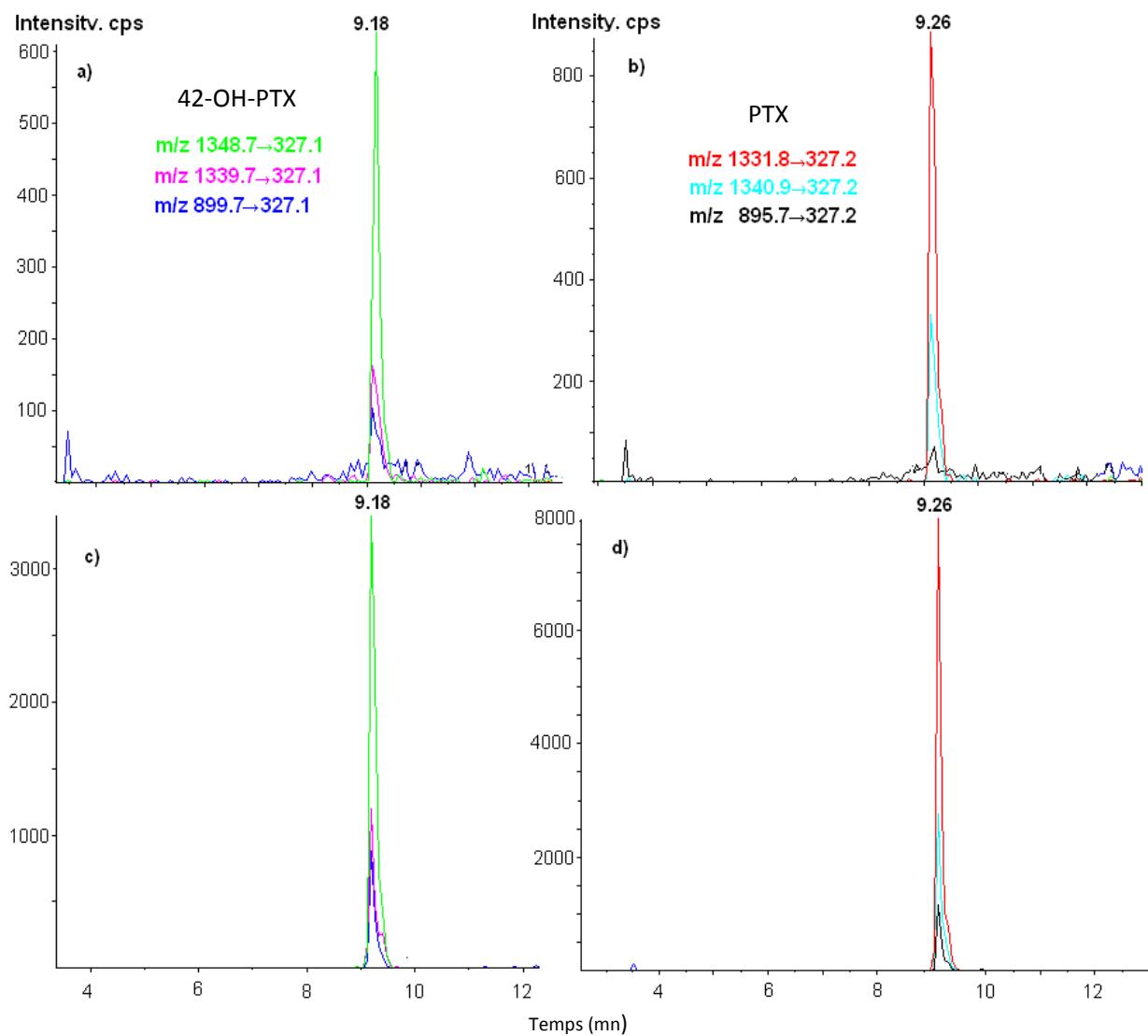


Figure 53 : Mise en évidence par analyse LC-MS/MS de la présence de 42-OH-PTX (a) et PTX (b) dans les échantillons de *Trichodesmium erythraeum*. Chromatogramme des standards de 42-OH-PTX (c), et PTX (d) (Wako).

Pour la première fois, la PTX et la 42-OH-PTx sont détectées dans des cyanobactéries marines.

L'analyse au moyen de la méthode multi-toxinique LC-MS/MS du laboratoire des phycotoxines à l'IFREMER a également été réalisée sur les extraits hydrosolubles et liposolubles de *Trichodesmium*. Les résultats montrent qu'aucune hépatotoxine, toxine diarrhéique, toxine paralysante ou FAT n'a pu être détectée. Cependant, des traces de cyanotoxines neurotoxiques (HAnTX-a) ont été suspectées. Des analyses complémentaires sont en cours.

III.4 Discussion

Les échantillons récoltés en saison chaude, en période de floraison des *Trichodesmium*, étaient majoritairement constitués de l'espèce *T. erythraeum*, espèce la plus fréquente dans le lagon calédonien, et dans une moindre mesure de l'espèce *T. thiebautii* (Rodier and Le Borgne, 2010).

L'utilisation combinée des tests souris, N2A et RBA et de la LC-MS/MS a permis d'évaluer leur potentiel toxique respectif ainsi que le risque qu'elles représentent pour les populations exposées à ces efflorescences.

III.4.a Complexe toxinique de *Trichodesmium*

Variabilité du profil toxinique en fonction de l'âge et du degré de pureté de l'efflorescence.

Compte tenu du protocole d'échantillonnage appliqué à ces cyanobactéries pélagiques, il est vraisemblable que les échantillons analysés différaient les uns des autres au niveau de l'âge des efflorescences. Or, c'est un critère qui peut avoir son importance, en raison des risques de relargage du contenu cellulaire des trichomes au sein de ces efflorescences à un stade avancé de sénescence.

En outre, comme souligné précédemment pour les cyanobactéries benthiques, il faut rester prudents quant à l'origine exacte des composés toxiques mis en évidence dans les extraits analysés : en effet, bien que largement dominées par les espèces de *T. erythraeum* voire parfois *T. thiebautii*, les mattes ayant servi à la préparation de ces extraits formaient manifestement des communautés biotiques complexes (Sheridan *et al.*, 2002). Seule l'obtention de cultures axéniques de *Trichodesmium* pourrait permettre de répondre formellement à cette question. En attendant, l'analyse globale permet en tout cas d'évaluer le risque que ces mattes représentent pour l'Homme et l'environnement (Ohki *et al.*, 1992 ; Chen *et al.*, 1996).

Composés liposolubles.

En 1992 et 1993, Hahn puis Endean et leurs co-auteurs étaient les premiers à signaler la présence concomitante chez *Trichodesmium* de composés hydrosolubles et de substances liposolubles similaires aux CTXs en terme d'activité (test souris), et d'un point de vue chimique.

Nos résultats sont en complet accord avec ces observations antérieures : ils indiquent en effet que les populations de *Trichodesmium* collectées en Nouvelle-Calédonie de 2007 à 2009 hébergent un complexe toxinique composé i) de toxines hydrosolubles à activité paralysante (test souris) associées à la PTX et 42-OH-PTX (LC-MS/MS), ii) de composés liposolubles d'activité non spécifique des CSSP (test N2A) et iii) de composés liposolubles d'activité spécifique du site 5 des CSSP (test RBA).

Ces composés ne sont pas tous présents en quantités équivalentes dans les échantillons analysés. L'une des explications aux différents profils toxiniques est exposée ci-dessus, mais ces

différences peuvent également être dues à des productions toxiques dépendantes du génome. Au-delà de ces facteurs génétiques, le potentiel toxinogénique de *Trichodesmium* peut dépendre aussi des pressions liées aux facteurs abiotiques (température, lumière, salinité) ou de facteurs biotiques (prédatation, associations avec des bactéries) (Guo *et al.*, 1994; Qiqin *et al.*, 1997; Negri *et al.*, 2004; Thacker *et al.*, 2004; Wiegand *et al.*, 2005).

Par ailleurs, et contrairement à ce qui a été observé par Ramos *et al.* (2005) et Proença *et al.* (2009) dans des populations de *T. erythraeum* collectées sur les côtes brésiliennes et aux îles Canaries dans lesquelles des traces de microcystines et de STXs avaient été détectées, aucune des phycotoxines et cyanotoxines connues (cylindrospermospine, nodularine-R et microcystines, toxines diarhéiques (DSTs), toxines paralysantes (STXs) et FATs) n'a été trouvée dans les *Trichodesmium* des lagons néo-calédoniens.

Présence des neurotoxines AnTX-a et HAnTX-a

Dans l'une des espèces d'Oscillatoriaceae benthiques récoltées à Lifou, *H. lyngbyaceum*, la présence de l'HAnTX-a et de faibles teneurs d'AnTX-a ont été clairement détectées en GC-MS (Méjean *et al.*, 2009). Le séquençage de la région ITS ARNr 16S - 23S et leurs alignements montrent de fortes similitudes phylogénétiques entre l'espèce analysée *H. lyngbyaceum* et *T. erythraeum* Z9 (99% de séquence identique) ainsi qu'avec *T. erythraeum* IMS 101 (98% de séquence identique) (annexe 3).

La toxicité des extraits hydrosolubles de *Trichodesmium* se manifeste chez la souris à travers des symptômes fortement similaires à ceux observés lors de l'injection de toxines pures d'AnTX-a et HAnTX-a (tableau 12). Ainsi, on peut raisonnablement émettre l'hypothèse que *Trichodesmium* est capable de produire de l'AnTX-a et/ou de l'HAnTX-a. Les dernières analyses LC-MS/MS montrent la présence, dans la plupart des échantillons analysés, d'une substance de même poids moléculaire et de même fragmentation que l'HAnTX-a mais caractérisée par un temps d'élution légèrement différent. L'isolement de cette substance devrait permettre de confirmer s'il s'agit d'un composé proche de même activité.

III.4.b Caractérisation de la PTX

Pour la première fois, la PTX et un de ses homologues (42-OH-PTX) ont été détectés chez une cyanobactérie (figure 3c ; figure 53). La PTX décrite précédemment est une des plus grandes molécules naturelles (Vale and Ares, 2007; Katikou, 2008; Wu, 2009). Ses mécanismes d'action expliquent les différents symptômes neurotoxiques (Katikou, 2007).

Les intoxications causées par la PTX (ou palytoxicose) s'avèrent souvent fatales. Ces intoxications résultent soit de l'inhalation ou du contact direct avec la PTX, soit le plus souvent de la consommation d'organismes concentrateurs de PTX comme les poissons et les crabes. Les symptômes sont des irritations cutanées, vomissements, fièvre, diarrhées sévères, paresthésies des extrémités, spasmes musculaires importants et la mort survient par détresse respiratoire. La

diversité de ces symptômes peut expliquer les assimilations à la ciguatéra classique (Kodama et al., 1989). Cependant, même si les tableaux sont proches, la prédominance des signes neurologiques centraux et l'altération de l'état de conscience sont particulières à la palytoxicose. Les traitements chez l'Homme sont uniquement symptomatiques.

Originellement isolée d'un Zoantharia, cette toxine est retrouvée chez de nombreux organismes marins comprenant, les dinoflagellés du genre *Ostreopsis*, les *Zoantharia* (genre *Palythoa* et *Zoanthus*), les anémones, les poissons (*Decapterus macromosa* et *Melichthys vidua*) ou encore les crabes (*Lymphozozymus pictor*) mais jamais dans le groupe des cyanobactéries (Gleibs et al., 1995 ; Katikou, 2007 ; 2008 ; Wu, 2009). *Ostreopsis* produit de nombreux analogues de la PTX : ostrécines, ostréotoxines, mascarénotoxines. Cependant peu d'éléments sont encore disponibles quant à la biogénèse de la PTX, confirmant le lien entre les analogues produits par *Ostreopsis* et la PTX, prouvant alors qu'*Ostreopsis* est à l'origine des intoxications dues à la PTX (Taniyama et al., 2003 ; Lenoir et al., 2004 ; Katikou, 2008).

III.4.c Impact sur l'environnement par voie bioaccumulative

Phénomène de bioaccumulation.

Les colonies de *Trichodesmium* constituent de véritables complexes écologiques (Sellner, 1997 ; Sheridan et al., 2002) sont utilisées comme substrats physiques ou/et de nourritures pour certains organismes. Comme mentionné précédemment, cette prédation rendant rapidement le zooplancton toxique peut être le point d'entrée de l'incorporation des toxines produites par *Trichodesmium* dans la chaîne alimentaire. Ainsi, *Trichodesmium* peut être potentiellement impliquée dans deux phénomènes connus : le clupéotoxisme et la ciguatéra.

Lien avec le clupéotoxisme

Comme nous l'avons exposé dans le 1^{er} chapitre, le clupéotoxisme est une intoxication à la PTX liée à la consommation de poissons pélagiques planctonophages de la famille des Clupéidés, sardines ou d'anchois des mers tropicales. C'est donc une forme de palytoxicose dont le vecteur principal est un poisson. Elle est plus fréquente dans les eaux tropicales et subtropicales (Kodama et al., 1989; Onuma et al., 1999).

Les poissons microphages vivant souvent en banc peuvent ainsi accumuler des toxines en se nourrissant dans les efflorescences de *Trichodesmium*. En Nouvelle-Calédonie, ces faits ont été rapportés dès 1877 : des mattes nommées *green monad* colorant les eaux et provoquant des érythèmes et des conjonctivites, servent de nourriture aux sardines responsables de cas d'intoxications (Randall, 2005 ; Deeds and Schwartz, 2009). Ces dernières sévissent également à Fiji et dans les mers des Caraïbes et peuvent s'avérer fatales à la suite de symptômes violents (Randall, 1958). Ces intoxications saisonnières sont suspectées d'être causées par les *Trichodesmium*.

Des cas d'intoxications de type ciguatérique provoqués par les mullets nous ont été rapportés (communications personnelles de pêcheurs locaux). Ces mugilidés sont des planctonophages et sont connus pour venir se nourrir de mattes constituées majoritairement de *Trichodesmium*. Nous avons pu personnellement observer ces mullets se nourrir dans les mattes de *Trichodesmium* dans la zone de pêche de Hunëtë en novembre 2008 et 2009.

Lien avec la ciguatéra

Les mattes de *Trichodesmium* récoltées contiennent des PTXs mais également des composés liposolubles cytotoxiques d'action non spécifiques des CSSP ainsi que des métabolites toxiques spécifiques du site 5 des CSSP. A l'instar de beaucoup d'oscillatoires benthiques, *Trichodesmium* peut donc potentiellement contribuer aux intoxications de type ciguatérique. En 1993, Endean l'avait déjà suggéré après analyse de thazards du large (*Scomberomorus commerson*) et de *Trichodesmium*. Nous apportons donc ici des éléments supplémentaires quant à l'implication de *Trichodesmium* dans la chaîne de contamination ciguatérique des poissons et autres organismes (Randall, 1958 ; Hahn and Capra, 1992 ; Endean *et al.*, 1993 ; Deeds and Schwartz, 2009).

Ces deux intoxications sont-elles communes ?

Le clupéotoxisme a longtemps été considéré comme une forme de ciguatéra (Deeds and Schwartz, 2009). Or, la rapidité et la sévérité des symptômes du clupéotoxisme associé aux nombres élevés de cas mortels (20%) le différencient de la ciguatéra classiquement provoquée par l'accumulation des CTXs produites par *Gambierdiscus*.

Cependant, les poissons pourraient accumuler des toxines d'origines différentes : produites par les dinoflagellés **et** les cyanobactéries benthiques ou pélagiques. Des cas d'intoxications sévères de type ciguatérique sont parfois difficilement attribuables aux intoxications aux PTXs ou aux CTXs (Deeds and Schwartz, 2009). Or, étant donné que ces toxines sont produites dans les mêmes zones (Litaker *et al.*, 2010 ; Rhodes, 2010), on peut raisonnablement penser que les poissons peuvent accumuler l'une et/ou l'autre et se constituer ainsi un complexe toxinique d'origines différentes et dont le potentiel毒ique s'en trouverait accru. Ainsi, nous pouvons proposer pour ce phénomène touchant les poissons, à travers un complexe toxinique (CTX-like, PST-like et PTXs) d'origine cyanobactérienne et/ou microalgale, la qualification de *Ciguatera Shellfish Poisoning*.

Risque sanitaire associé aux efflorescences à *Trichodesmium*

De par leur toxicité, ces efflorescences de *Trichodesmium* représentent un risque potentiel pour les populations qui y sont exposées, soit par contact direct soit par voie bioaccumulative. Il nous a été rapporté des formes de conjonctivites ou de démangeaisons chez des enfants se baignant dans des mattes de *Trichodesmium*, qui rappellent le phénomène

d'irritation par inhalation connu sous le nom de *Tamandaré fever* ou *Trichodesmium fever* dans le nord-est du Brésil (Sato *et al.*, 1963).

Or, à ce jour, il n'existe aucune réglementation, ni politique de prévention vis à vis des risques liés aux efflorescences à *Trichodesmium*, pourtant fréquentes dans les régions tropicales, qui traduit une méconnaissance des oscillatoriales et des cyanobactéries benthiques marines en général. Par ailleurs, jusqu'en 2005, les quantités maximales de PTX dans les mollusques n'étaient pas réglementées. Depuis cette date, la commission des laboratoires de référence a fixé la limite sanitaire à 0,250 µg de PTX / g de chair (Ledreux *et al.*, 2009).

Dans notre cas, les concentrations estimées étaient de l'ordre de 0,3 à 1,1 µg eqv de PTX total / g de matériel biologique lyophilisé (tableau 41), indiquant que le seul risque lié au développement de *Trichodesmium* chez l'Homme réside, non pas au niveau des eaux de baignade, mais dans la consommation de mollusques ou de poissons ayant bioaccumulé les toxines produites par cette cyanobactérie pélagique.

III.4.d Impact direct sur l'environnement

Trichodesmium est naturellement présent dans l'environnement, et seules quelques études font état de ses impacts sur l'écosystème (Sellner, 1997). Il a notamment été démontré que certaines de ces efflorescences avaient des effets négatifs en aquaculture (Preston *et al.*, 1998 ; Negri *et al.*, 2004 ; Krishnan *et al.*, 2007). Mais indépendamment de sa toxicité, les efflorescences de *Trichodesmium* ont un impact certain sur les écosystèmes lagunaires, notamment par la réduction de la pénétration de la lumière qui entraîne une mortalité accrue des récifs de coraux ou des populations d'huîtres perlières (*Pinctada maxima*) (Negri *et al.*, 2004), par des phénomènes d'anoxie ou encore par l'augmentation anormale des teneurs en métaux ou en éléments nutritifs (Jones, 1992) provoqués par la dégradation excessive de la matière organique.

III.5 Conclusions

L'ensemble de ces données écotoxicologiques confirme la toxicité des mattes de *Trichodesmium* et apporte des éléments sur le complexe toxinique que *T. erythraeum* et *T. thiebautii* représentent. En outre, pour la première fois, la PTX et son homologue 42-OH-PTX ont été détectées chez une cyanobactérie marine.

Trichodesmium est donc une actrice potentielle dans les phénomènes de bioaccumulation du clupéotoxisme et de la ciguatéra.

Des analyses sont en cours pour caractériser les toxines de ce complexe. Ceci permettra par la suite de mettre en évidence les voies de contamination pour ainsi identifier clairement les organismes à risque pour l'Homme.

IV. Conclusions du chapitre 2

L'ensemble de ces éléments (implication des cyanobactéries associant un complexe toxinique et de nouveaux vecteurs comme les bénitiers) apporte une meilleure connaissance du phénomène écotoxicologique environnemental qu'est la ciguatéra au sens large et doit permettre de mieux appréhender le système d'évaluation et de gestion du risque d'intoxications par les produits de la mer dans les régions coraliennes. Les dinoflagellés ciguatoxinogènes et les cyanobactéries sont des indicateurs de l'état des récifs et sont des composants essentiels à une stratégie de surveillance environnemental ciguatérique, véritables outils d'une veille sanitaire.

Jusqu'à présent, la plupart des études de phénomène ciguatérique sont des études rétrospectives menées à la suite de déclarations d'intoxications. Une zone est ainsi déclarée « ciguatérique » lorsqu'il est possible d'identifier l'origine de pêche et de vie des poissons contaminés. La genèse du complexe ciguatérique pouvant mettre 1 à 3 ans pour s'établir : à partir d'une efflorescence de microorganismes toxinogènes (1^{er} maillon de la chaîne) jusqu'à son accumulation aux poissons incriminés atteignant le seuil de toxicité pour l'Homme, l'intervention d'une équipe de recherche ou le démarrage d'une étude écotoxicologique sera très tardive pour bien apprécier l'origine du phénomène.

En revanche, l'implantation dans la baie de Prony de l'usine d'extraction de Nickel et de Cobalt de Vale (ex GoroNickel) engendrant des changements dans l'écosystème récifal fut une opportunité pour notre équipe de mener une étude prospective.

A travers ces travaux de thèse, nous avons souhaité évaluer l'état de référence « ciguatérique » des poissons de la baie et des alentours. Pour ce faire, nous avons mis en place un plan de surveillance de la zone de Prony, en développant des outils de veille sanitaire, qui pourra nous permettre une meilleure compréhension de l'apparition de zones ciguatériques ; une étude écotoxicologique de l'atoll d'Ouvéa, réputé indemne de ciguatéra, est réalisée en parallèle. Il est évident que le suivi de l'évolution de ces cyanobactéries filamentueuses en termes de présence et de toxicité est primordial et doit donc être intégré, à part entière, à un suivi environnemental.

Chapitre 3 :
La ciguatera et
les facteurs environnementaux :
Etudes à Ouvéa et en Baie de Prony

Chapitre 3 : La ciguatéra et les facteurs environnementaux : Etudes à Ouvéa et en baie de Prony

I. Introduction

Dans le chapitre 2, nous avons pu mettre en évidence l'implication des cyanobactéries dans certaines formes d'intoxications qui peuvent être assimilées à la ciguatéra. Au stade de nos recherches, nous ne pouvons affirmer que les cyanobactéries produisent des CTXs. Cependant, elles produisent des composés proches qui peuvent se bioaccumuler dans la chaîne alimentaire et contaminer certains organismes marins comme les bénitiers ou les autres mollusques. Porteurs de toxines, ils provoquent des intoxications jusqu'alors inexpliquées, similaires en certains points au syndrome ciguatérique classique mais dont les vecteurs peuvent être différents. Nous avons proposé de nommer l'ensemble de ces intoxications *Ciguatera Shellfish Poisoning* ou **Intoxication ciguatérique par produits de la mer**.

Qu'il s'agisse d'intoxication ciguatérique classique induite par les dinoflagellés ou d'une ciguatéra similaire causée par les cyanobactéries, le déterminisme du phénomène écotoxicologique n'est pas clairement caractérisé. Dans le premier chapitre, nous avons fait état des facteurs naturels ou anthropiques connus pour favoriser le développement de zones ciguatoxinogènes (cf. ch.1.II.7). La survenue d'une flambée ciguatérique est souvent soudaine et intervient sans que le ou les facteurs déclencheurs n'ai(-en)t pu être caractérisé(-s). Les études scientifiques qui tentent d'étudier ce phénomène sont souvent rétrospectives faisant suite à des déclarations d'intoxications ou des interviews qui permettent de localiser la zone incriminée. Or, dès lors que les toxines sont à des niveaux de concentrations suffisants pour affecter l'Homme, on peut estimer que les efflorescences de micro-organismes ont eu lieu de 6 à 18 mois avant d'atteindre l'étage trophique « Homme » (Chinain *et al.*, 1999a ; Château-Degat *et al.*, 2005).

Dans ce troisième chapitre, les résultats de deux études écotoxicologiques sont présentés : l'une sur Ouvéa, réputée indemne de ciguatéra, et l'autre dans le Sud de la Grande Terre à Prony, constituant pour la première fois une étude prospective (figure 54). L'étude menée sur un site réputé indemne de ciguatéra (site témoin) a pour objectif d'évaluer le niveau de ciguatoxicité de différents maillons pisciaires sur des sites considérés comme sans, ou avec faible pression anthropique. De manière générale, les perturbations programmées d'un environnement récifal sont considérées comme de potentiels facteurs favorisant potentiellement la naissance de flambée ciguatérique. Aussi afin d'anticiper et de tenter de caractériser les facteurs de développement de ciguatéra dans une zone dite à « risque », nous avons mis en place un plan d'étude permettant à la fois d'évaluer et de prévenir le risque.

Dans ce chapitre, après un bref aperçu de travaux antérieurs, nous présenterons les deux suivis écotoxicologiques effectués à Ouvéa et en Baie de Prony, les méthodologies mises en œuvre en justifiant nos choix adaptés à l'un et à l'autre des sites, les résultats et la discussion.



Figure 54: Carte de la Nouvelle-Calédonie : situations d'Ouvéa et de l'implantation de l'usine de Vale NC dans le sud de la Grande Terre.

I.1 Contexte

I.1.a La ciguatera et son déterminisme

Nous avons vu dans le chapitre 1 que les modifications de certains paramètres environnementaux peuvent favoriser le développement de zones ciguatériques. La création de «nouvelles surfaces» résultant de la destruction corallienne d'origine naturelle (tsunami, cyclone, pluies exceptionnelles...) ou anthropique (eutrophisation, dragage, construction de digue ...), favorise la prolifération de microorganismes ciguatoxinogènes. En effet, ces substrats vierges peuvent être colonisés par des macroalgues opportunistes, supports privilégiés des dinoflagellés, ou directement par les cyanobactéries. Si ces microorganismes sont constitués de souches toxinogènes, les toxines produites peuvent rentrer dans la chaîne alimentaire via les poissons herbivores ou les mollusques pour être bioaccumulées et biotransformées le long de la chaîne trophique.

Le déterminisme du phénomène ciguatérique a toujours été un enjeu majeur pour les populations et les institutions des pays des zones endémiques. Afin de pouvoir évaluer et prévenir les zones à risque mais aussi dans une optique de développement durable, il est important de pouvoir prédire les effets des constructions littorales ou des activités humaines de manière générale sur le récif. Or, les études environnementales s'orientent toutes vers des zones ciguatériques pour comprendre l'origine du phénomène qui est alors antérieure. Retracer l'histoire écologique d'une zone (données météorologiques, physico-chimiques, inventaire des impacts anthropiques...) ainsi que recueillir des données épidémiologiques, peut être parfois difficile. Ainsi l'étude menée à Lifou suggère fortement que les perturbations liées à la

construction de la rampe de mise à l'eau en 1999 furent la cause première de l'installation des cyanobactéries reconnues toxiques. Cependant, ces hypothèses ne peuvent être approuvées formellement.

I.1.a.1 Exemple d'études écologiques : Hao, Tuamotu en Polynésie Française (Bagnis, 1969)

En 1969, une étude écotoxicologique relativement complète est menée dans l'atoll de Hao aux Tuamotu en Polynésie française (Bagnis, 1969). Hao, indemne de ciguatéra avant 1965, est subitement touchée par des intoxications graves. En 1965, la construction d'un aérodrome et d'un port nécessite d'importants travaux de dynamitage, d'endiguement, de terrassement ; ceux-ci sont associés à une augmentation brutale de la population dans la partie nord-est de l'anneau corallien. Les premières hospitalisations pour des cas d'intoxications ciguatériques sont relevées en novembre 1966. Les cas de ciguatera prennent naissance dans les zones d'accostage des bateaux approvisionnant les travaux en matériaux puis, un à deux ans après, s'étendent progressivement aux aménagements du récif. Il est à noter que les premiers cas d'intoxications sont dus à des poissons corallivores ou herbivores. Les poissons incriminés dans les années suivantes sont des poissons de régime piscivore.

Cette étude a permis de tirer des conclusions significatives de corrélations entre les perturbations de zones récifales procurant de nouvelles surfaces vierges et la contamination de poissons. Les données ont permis également de noter une progression spatiale et temporelle de la zone toxique ainsi qu'une affectation progressive des poissons vers le haut de la chaîne trophique.

En terme de temps, d'après le nombre de cas d'intoxications recensés, la toxicité a touché les poissons de bas de chaîne dès l'année suivant les travaux et il semble que le facteur risque fut le plus important en 1968 (2 ans après les travaux) pour diminuer sensiblement ensuite. Cependant, les intoxications affectent encore la population en 1973 (7 ans après, dernières données disponibles). Une étude écologique approfondie aurait permis de dire si cette diminution correspond réellement à un retour à l'équilibre de l'écosystème. Il est en effet probable que la population soit moins affectée suite à un changement de comportement alimentaire en évitant tout simplement les poissons connus pour être ciguatoxiques.

Les données statistiques recueillies prennent en compte également les empoisonnements causés par d'autres organismes que les poissons tels les échinodermes, les crustacés ou les mollusques, tout en donnant une symptomatologie ciguatérique typique. Cependant, il apparaît que les cas les plus graves soient dus à la consommation de poisson de la famille des carangidés qui sont devenus toxiques 18 mois après les perturbations liées aux constructions.

Cette étude a permis de suivre la croissance du phénomène à un stade récent et en extension durant lesquels les herbivores ou corallivores sont dans un premier temps les plus

toxiques, puis quelques temps plus tard les carnivores. Le degré de toxicité par espèce de poissons selon leur niveau trophique permettrait donc de dater l'évolution du phénomène toxique dans une zone et déterminer ainsi si celui-ci est en phase de croissance, d'extension ou de sénescence. Par ailleurs, lors de l'extension d'une zone ciguatérique, les zones de pêche éloignées du point de « hot-spot » de ciguatoxicité, présenteront des poissons toxiques de bas de chaîne (chirurgiens, perroquets, mulets).

1.1.a.2 Exemples de facteurs favorisants

Impact des activités humaines sur le récif

Les diverses atteintes de l'intégrité physique et biologique de l'écosystème corallien entraînent des dysfonctionnements qui peuvent être à l'origine de la perte de ressources riches et diversifiées. Ces perturbations peuvent être de divers ordres que l'on observe fréquemment dans les îles du pacifique :

Techniques de pêches

Dans les îles, les activités traditionnelles, actuelles ou ancestrales, sont très riches et sont parfois difficiles à caractériser. En ce qui concerne l'activité traditionnelle de la pêche, les différentes techniques utilisées constituent une pression importante voire destructrice sur les zones ciblées et en particulier sur les zones récifales facilement accessibles.

Les pêches traditionnelles à pied (retournement des coraux et piétinement) peuvent également de manière plus discrète mais répétée détruire les massifs coralliens et être la cause de dégradations suffisantes de zones coraliennes pour entraîner le développement de zones toxiques. Ainsi des flambées ciguatériques ont été observées dans les atolls polynésiens fortement impactés par l'activité perlière : cycliquement, une à deux années après les saisons de récolte perlière, les zones de pêches regorgeaient de poissons ciguatoxiques (Bagnis, 1974).

L'utilisation de la dynamite, courante dans certaines tribus de Nouvelle-Calédonie, a été une méthode de pêche facile et ce, pendant de nombreuses années. Très destructrice de l'écosystème corallien, cette pratique qui procurait de « belles » surfaces vierges propices au développement des micro-organismes ciguatoxinogènes, est à ce jour condamnée par les autorités tribales.

De nouvelles surfaces artificielles : Epaves ou immersion de matériaux

De nombreux exemples rapportent également la création de nouvelles surfaces artificielles. Dans les îles, à la suite d'immersion d'épaves ou de matériaux divers notamment après la guerre dans certaines régions du Pacifique, il a été observé le développement de zones où les poissons étaient ciguatoxiques 12 à 18 mois après l'action humaine (Halstead, 1965 ; Bagnis, 1974).

Dans certaines îles du Pacifique, de véritables dépotoirs sous-marins ont été créés faute de traitement adéquat des « nouveaux » déchets (emballage plastique, aluminium, batteries etc...) comme ce fut le cas à Manihi (Archipel des Tuamotu en Polynésie Française) à la suite d'une « opération de propreté » de l'atoll. Ces dépotoirs constituent ainsi des substrats vierges et induisent également des pollutions détruisant le corail (pile, essence...). Ces substrats vierges peuvent provenir d'activités plus récentes comme les plates-formes pétrolières qui offrent de nouvelles zones d'extension des proliférations de dinoflagellés (Villareal *et al.*, 2007).

Aménagement du littoral

L'extraction massive de coraux et de sable corallien pour les constructions ou les remblais dégrade de manière irrémédiable le lagon. A Fidji, par exemple, plus d'1,2 millions de tonnes de matériaux ont été extraits des lagons en moins de 20 ans. En 1983, 17,5 hectares de récifs barrières avaient été supprimés. A Tahiti, 1,6 millions de tonnes de matériaux coralliens avaient déjà été extraits avant que le gouvernement régularise ces pratiques. En plus de ces dégradations par excavation, la turbidité engendrée par de tels travaux de construction peut provoquer des mortalités massives de colonies coraliennes comme ce fut le cas lors de la construction de l'aéroport de Faaa. Les aménagements du littoral peuvent donc changer l'équilibre de l'écosystème corallien et entraîner la mort des polypes par l'augmentation de la turbidité, par la diminution des échanges avec l'océan et en favorisant l'envasement.

Urbanisation en bande récifo-lagonaire

De nombreux cas d'aménagement des zones récifales ont été rapportés de mémoire, perturbant l'environnement récifo-lagonaire en procurant de nouvelles surfaces ou changeant l'hydrodynamisme local comme c'est le cas dans les deux études présentées en chapitre 2 à Lifou et à Raivavae (Chinain *et al.*, 2010a).

Impact climatique et changement climatique global

En 1990, le rapport du groupe de travail n°2 du comité intergouvernemental sur le changement climatique (IPCC/WMO –UNEP -1990) prévoit : (i) un doublement de la teneur en CO₂ d'ici 2025 à 2050, (ii) une augmentation du niveau de la mer de 30 à 50 cm d'ici 2050 et (iii) une augmentation des températures moyennes de surface de 0,2 à 2,5°C d'ici 2050 (Dupon, 1993). Ces conséquences peuvent favoriser sur divers plans les flambées ciguatériques : l'augmentation du CO₂ entraînant des mortalités coraliennes favorisera les substrats vierges, les montées des eaux vont induire la construction d'infrastructures sur le littoral donc également des substrats vierges et enfin l'augmentation des températures pourra provoquer des mortalités coraliennes ou favorisera directement les proliférations de micro-organismes participant ainsi à l'extension de leurs zones de répartition.

De plus, les prévisions du changement climatique iraient de pair avec une augmentation des phénomènes météorologiques majeurs (cyclone, tsunami), facteurs favorisants des dégradations corallieennes (Hales *et al.*, 1999 ; Lehane and Lewis, 2000).

Afin d'expliquer les liens existant entre les dégradations du milieu et les développements de zones ciguatérigènes, deux sites d'études ont été sélectionnés pour leurs caractéristiques, le site d'Ouvéa et celui de la baie de Prony, qui font l'objet des travaux présentés dans cette partie. Mais quelles sont les caractéristiques de ces milieux et, en tenant compte des connaissances actuelles et des études précédentes sur le sujet, quelles sont les zones subissant des pressions anthropiques ?

I.1.b Ouvéa : atoll réputé indemne de ciguatéra

Ouvéa est l'île la plus septentrionale de l'archipel des îles Loyauté, située à environ 100 km à l'est de la grande terre. Elle se distingue de ses consœurs par son grand lagon d'une superficie de 872 km² (figure 55). Il est protégé des alizés SE sur 50 km, par un croissant corallien de 132 km². Constitué à 96% de fonds de lagon (le reste de récifs émergeants), la profondeur moyenne du lagon est de 15 à 20 m, avec un fond incliné en pente douce. Il est délimité par les Pléiades Sud et les Pléiades Nord formant des falaises élevées sur toute la partie océanique au sud-est et au nord.

La vie d'Ouvéa (3 390 habitants au recensement 2009) est tournée vers la mer et les ressources qu'elle offre (pêche vivrière et tourisme essentiellement). Depuis le 8 juillet 2008, certaines régions en Nouvelle-Calédonie dont l'atoll d'Ouvéa sont classées sur la Liste du Patrimoine Mondial de l'Humanité.

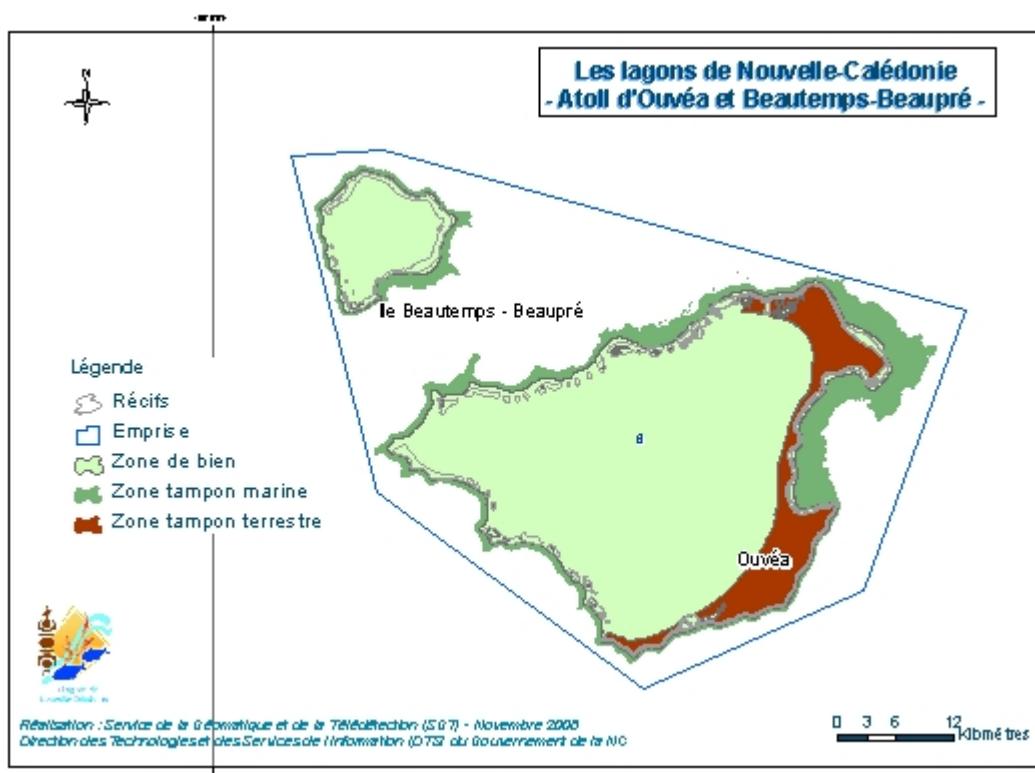


Figure 55 : Carte d'Ouvéa, délimitation de la zone inscrite au Patrimoine Mondial de l'Humanité.

La Province des îles Loyauté enregistre de nombreux cas de ciguatera dans les îles de Lifou et de Maré. En revanche, le poisson d'Ouvéa semble aujourd'hui épargné par ce phénomène et continue de bénéficier d'une excellente réputation, représentant de ce fait une perspective de développement des plus intéressantes pour la pêche artisanale lagunaire. La Province des îles travaille actuellement sur la relance du secteur de la pêche par la redynamisation de ses acteurs et par la mise en place de structures de conditionnement. Afin d'évaluer scientifiquement le niveau ciguatérique des populations présent à Ouvéa, la Province des îles a fait appel aux compétences de l'IRD. Jusqu'en 2007, les principales pressions anthropiques subies par l'environnement que nous avons pu identifier sont les constructions du quai de Wadrilla et les rampes de mise à l'eau présentes à différents sites de l'atoll. Les résultats de ces travaux permettent de constituer un témoin négatif.

I.1.c La baie de Prony

I.1.c.1 La baie de Prony : un écosystème singulier

La baie est située dans le sud de la Grande Terre. Elle présente un paysage rouge caractéristique de la terre latéritique du sud (photo 86). Les reliefs alentours sont relativement accentués : elle possède de multiples ramifications des bras de mers. La rivière blanche et bleue ainsi que de nombreux autres cours d'eau se jettent dans la baie.



Photo 86 : La baie de Prony, baie calme et enclavée aussi appelée la baie anticyclonique.

La baie de Prony est un site très particulier de par son enclavement, la protection qu'elle procure et les formations géologiques connues encore nulle part ailleurs (sources hydrothermales à petites profondeurs). C'est une baie fermée, très calme et profonde, avec des apports terrigènes importants. Elle abrite une faune et une flore qui peuvent être très particulières. Les constructions corallieennes sont de grandes tailles et fines constituées d'espèces adaptées aux eaux turbides et aux arrivées d'eau douce.

La pointe de la Grande Terre constitue une des zones inscrites au Patrimoine Mondial de l'Humanité. Impliqué dans le suivi environnemental de la zone, Vale NC a mis en place 18 points de contrôle marin et de suivi des écosystèmes coralliens dans le canal de la Havannah (sur les récifs coralliens les plus proches du diffuseur, dans la réserve Merlet, à l'Est et à l'Ouest du diffuseur, à l'entrée de Port boisé...), en baie de Prony et dans le canal Woodin.

La faune ichthyologique de la baie de Prony reste relativement limitée. Les *Pomacentridae* (poissons clown ou demoiselles) sont présents avec une quinzaine de taxa. La saumonée *Plectropomus leopardus* domine en biomasse la baie comme au niveau du canal Woodin (Données de l'analyse éco-régionale de NC 2006).

I.1.c.2 *Implantation de l'usine de Vale Nouvelle-Calédonie*

I.1.c.2.a Le projet

Vale Nouvelle-Calédonie (Vale NC) du groupe Vale (anciennement Goro Nickel NC puis Vale-Inco NC) est une entreprise d'extraction de minerai et de production de nickel et de cobalt. Le complexe minier et industriel est situé dans le sud de la Grande Terre pour exploiter le gisement latéritique du plateau de Goro (figure 56).



Figure 56 : Carte de la zone du sud de la Grande Terre et de l'implantation des différentes infrastructures de Vale NC.

Historique

Les débuts de l'exploration minière du gisement ont été entrepris par COFIMPAC, une filiale d'Inco, en 1969. En 1992, Inco récupère des droits miniers sur le gisement de Goro mais les teneurs en nickel le rendent encore inexploitable par les procédés d'extraction chimique disponibles. L'usine pilote est construite en 1998 pour mettre en place un procédé adapté aux faibles teneurs de nickel et cobalt du gisement. C'est à partir de 2000 qu'un programme minier intensif est mené dans la zone de Goro Sud en vue de sa future exploitation. En 2004, le projet actuel est mis en route.

Le gisement

Le plateau de Goro est un gisement classique constitué de latérites en surface (oxydes de fer), de saprolite en profondeur (silicates magnésiens) et de la roche mère périclithique. Le gisement de nickel et de cobalt de la couche latéritique jaune (limonite) et de la couche saprolitique sont quantitativement l'un des plus importants du monde (120 millions de tonnes) mais les teneurs relativement faibles en nickel (moyenne de 1,48%) et en cobalt (moyenne de 0,11%) ont conduit Vale à étudier et à développer le procédé d'extraction en hydrométallurgie. Le cobalt n'étant pas encore exploité dans les mines de Nouvelle-Calédonie, c'est ce procédé qui va permettre de le valoriser. L'objectif de Vale NC est de produire annuellement 60 000 tonnes de nickel et 4 500 tonnes de cobalt, soit 10% de l'offre mondiale en cobalt.

Le procédé hydro-métallurgique

L'ensemble du procédé, consiste à réduire (i) le minerai en pulpe (broyage et ajout d'eau), (ii) extraire en milieu acide à haute pression le nickel et le cobalt (lixiviation) et (iii) à la suite de différentes étapes de purification, solidifier ces deux éléments sous forme d'oxyde de nickel et de carbonate de cobalt respectivement.

A l'issue de ces opérations, deux formes de résidus sont produites, solides et liquides. Les résidus solides sont constitués du matériau dont le cobalt et le nickel ont été extraits et auquel du calcaire a été ajouté pour sa neutralisation (29%). Ils seront stockés dans des bassins de stockage prévus à cet effet par recouvrement d'une géo membrane (photo 87). L'arrêté de l'exploitation de la zone de stockage des résidus solides est obtenu en octobre 2008. Quant aux résidus liquides, un traitement physico-chimique permet de les neutraliser et de ramener leurs teneurs en métaux à des valeurs respectant les normes environnementales obligatoires pour pouvoir les rejeter en mer. Une usine de traitement est dédié à ce travail



Photo 87 : Vallée de la Kwe Ouest où se construisent les bassins de stockage des résidus solides.

Le projet et la société

Une étude des impacts socio-économiques et socioculturels de la construction du projet menée en 2007 avec les populations mentionne en premier lieu l'inquiétude des populations face à l'impact potentiel de l'usine sur l'environnement : « *La possible détérioration de l'environnement marin par le rejet en mer, et l'impact potentiellement négatif sur la pêche qui en découle, est la première préoccupation environnementale de la population.* ». Or, Vale NC, responsable de ce projet de grande envergure, travaille de plus en plus avec les populations locales afin que ce projet grandisse en partenariat avec tous pour un développement durable tenant compte de l'écologie, de l'économie et de l'humain.

Les obligations et les engagements de Vale NC pour l'environnement

Les arrêtés relatifs aux autorisations ICPE (Installation Classée pour la Protection de l'Environnement) de l'usine et de l'aire de stockage des résidus sur la Kwe Ouest ont été signés avec la Province Sud en octobre 2008. Ces deux arrêtés prescrivent les règles à suivre en

matière d'exploitation, de surveillance des émissions et de suivi environnemental afin de préserver au mieux l'environnement, ainsi que la santé et la sécurité publique.

Afin de concilier la sauvegarde de la biodiversité et ce projet de construction d'usine et de mine d'extraction de minerai, Vale NC a entrepris une démarche de prise en considération et de sauvegarde de la biodiversité. Ses engagements sont de :

1. Eviter le plus possible les zones sensibles au moment de la conception,
2. Minimiser l'empreinte en réduisant les installations ou leurs émissions,
3. Restaurer les zones d'empreinte dès que possible,
4. Compenser les effets résiduels (en dernier lieu, après atténuation maximale de ces effets).

Cette démarche est prise en compte pour chacune des infrastructures mises en place dans le cadre de ce projet et à chaque étape de progression temporelle de ce projet.

I.1.c.2.b Les infrastructures

L'usine

Une usine pilote expérimentale a d'abord été testée en 2000 et 2001. La construction de l'usine industrielle a démarré en 2002 (photos 88 et 89). L'arrêté d'exploitation de l'usine est obtenu en octobre 2008. Au premier trimestre 2010, sa construction est achevée. Elle est actuellement en phase de test (phase de *commissioning*) et doit entrer en production avant 2011.



Photos 88 et 89 : Usine en travaux en 2002 et en 2006.

La base vie

La base vie, implantée à proximité de l'usine, a eu une capacité maximale d'accueil de 4 500 personnes ; en période de production, elle sera limitée à 1 500 lits (photo 90). L'installation de cette *petite ville* peut avoir des conséquences quant aux rejets domestiques qu'elle génère. Les rejets étant intégralement traités par des stations d'épuration mises en place sur le site, ils ne devraient pas perturber le lagon. Les seules perturbations éventuelles sur le lagon liées à l'arrivée massive de cette population de travailleurs seraient dues aux activités récréatives de la population (activités plaisancières, pêche, bateau, ancrage...) qui à priori, restent limitées. Il paraît donc raisonnable d'estimer que l'impact direct de cette population sur l'environnement marin reste faible, et dans tous les cas, elle n'est pas prise en compte dans notre étude d'impact potentiel pour présenter un risque ciguatérique dans la zone de la baie de Prony.

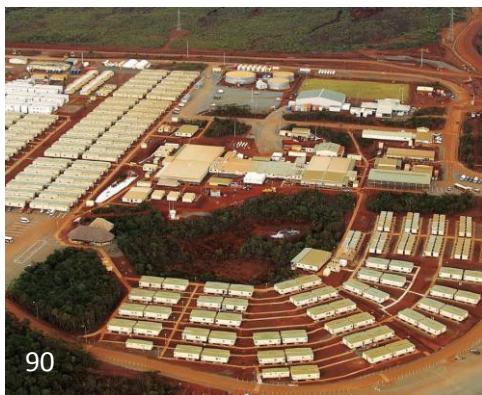


Photo 90 : Vue aérienne de la base vie de l'usine du sud.

Le port de Prony

Construit à partir de 1999 dans les premières étapes du chantier afin de permettre la construction de l'usine (photos 91 et 92), le Port de Prony permet l'importation de matériaux de construction sur mines ainsi que celle des divers matériaux nécessaires au procédé d'extraction (2 millions de tonnes de matériaux (solides et liquides) par an en transit). Il a également vocation à l'exportation du nickel et du cobalt à raison de 4 500 conteneurs par an. Ceci constitue un trafic de 2 à 3 navires par semaine géré par près de 150 personnes lors de la production à plein régime. L'arrêté de son exploitation date de juillet 2007.

Le Port est constitué de deux quais de 90 m et 180 m de longueur montés sur pieux afin d'éviter au maximum les remblais et les dragages (photos 93 et 94), cette technique dite du tablier a permis d'éviter de remblayer une partie de la baie pour construire une structure sur fondations traditionnelles. En outre, de par la géomorphologie de la baie, il n'a pas été nécessaire de creuser un chenal ni de remblayer. Lors de la construction du Port et de la mise en place des piliers de soutènement des pontons en pleine eau, le tonnage du dragage fut limité mais il a tout de même donné lieu à une turbidité passagère. Durant les travaux d'endiguement, des « barrages flottants » ont été installés afin de diminuer la dispersion des apports terrigènes.



91



92

Photos 91 et 92 : Vues du port de Prony au début de sa construction en 2002 et en fin de construction en 2007.



93



94

Photos 93 et 94 : Vues aériennes du port constitué de ses deux quais montés sur pieux (93) dont l'un est relié à l'usine par un convoyeur (94).

Le tuyau et son effluent

Composition de l'effluent

L'effluent, rejet traité des résidus liquides, est constitué de divers sels (magnésium, calcium, sulfate, chlorure de sodium ou manganèse) dont les concentrations sont contrôlées afin de ne pas dépasser les seuils réglementaires environnementaux. Le traitement de ce résidu liquide consiste à ajuster ses paramètres physico-chimiques afin qu'ils se rapprochent de ceux de l'eau de mer.

Le mode d'acheminement : le tuyau, son tracé

Le déversement s'effectue en mer au niveau du chenal de la Havannah grâce à un tuyau immergé de 80 cm de diamètre et de 23 km de long. Son tracé le fait passer par le Port de Prony, plonger dans la Baie de Prony, contourner le cap N'Doua, et se diriger vers le nord-est pour rejoindre le Canal de la Havannah (figure 56). Des observations des fonds marins ont été effectuées par robot et/ou par plongeurs, tout le long du trajet prévu par l'émissaire, afin d'évaluer les zones les plus appropriées et d'éviter les récifs coralliens et les zones de haute sensibilité écologique. Au niveau côtier et dans le Port de Prony, l'émissaire est placé dans une

tranchée pour assurer sa sécurité. Installé en fin 2008, son parcours s'étend sur des zones majoritairement sableuses et vaso-détritiques, avec dans certaines zones des colonies de coraux éparses. Une fois posé au fond, sa profondeur moyenne est de 35 à 40 m de fond. La zone d'immersion située au port a nécessité le creusement et l'aménagement d'une digue d'enrochement, à partir d'octobre 2008 (photo 95).



Photo 95 : Zone d'immersion du tuyau, avril 2008

L'extrémité de cet émissaire, située en face de la baie Kwé à 4 km de la côte et par 35 m de fond (figure 56), est constituée d'un diffuseur de 1 km comportant 200 orifices. L'objectif de cette structure est de permettre une dilution rapide et efficace de cet effluent afin de ne pas perturber l'environnement proche de l'émissaire. La zone d'immersion a été validée par expertises indépendantes, pour être la plus efficace pour la diffusion de l'effluent. Des essais à l'aide de traceurs colorés ont permis d'évaluer la dynamique du rejet et la dilution de l'effluent à l'extrême de l'émissaire afin de valider sa conception et la modélisation. Au premier semestre 2010, il est toujours en « phase d'essai » par utilisation de colorant injecté en amont du tuyau.

I.2 Bilan et synthèse du contexte

Ouvéa

Jusqu'à présent, en ce qui concerne le risque ciguatérique, aucune étude n'a été menée à Ouvéa. À notre connaissance et d'après les populations, il n'y a jamais eu de flambée ciguatérique nécessitant une étude écotoxicologique, même si quelques cas d'intoxications nous ont été rapportés. Il s'avère donc intéressant d'évaluer le potentiel ciguatoxique de ces populations de poissons de cette île et de déterminer si, comme le propose Bagnis et Vernoux (1986), les poissons possèdent tous un niveau de CTXs résiduels en deçà du seuil symptomatique chez l'Homme (Dickey and Plakas, 2010).

La baie de Prony

L'implantation de l'usine de Vale NC dans le Grand Sud de la Nouvelle-Calédonie constitue un terrain d'étude privilégié pour observer la succession possible d'étapes précurseurs des intoxications ciguatériques. Nos études devraient nous permettre de confirmer d'une part que les changements environnementaux liés aux impacts anthropiques peuvent être considérés comme perturbateurs et favoriser le développement des dinoflagellés et des cyanobactéries et d'autre part d'analyser l'évolution au cours du temps du taux résiduel éventuel de toxines dans la chaîne alimentaire de cette baie.

En effet, étant donné i) les infrastructures liées à l'implantation de l'usine, ii) les éléments qui jouent un rôle dans le déterminisme de la ciguatera et iii) le contexte particulier de la baie de Prony, certaines zones sont susceptibles d'être modifiées et de présenter des facteurs favorisant le développement des micro-organismes.

Deux types de zones peuvent présenter un terrain favorable à ce développement, et entraîner un risque potentiel de ciguatera:

- Les zones dont l'environnement physique change de manière immédiate comme les digues ou les creusements de chenaux,
- Les zones susceptibles d'être perturbées par l'activité ou les changements environnementaux, notamment par de fortes pluies (apport sédimentaires et apports d'eau douce).

La **zone du Port de Prony** et plus particulièrement **les zones d'endiguement** répondent à ces critères et méritent donc une surveillance continue. En effet, à court terme (quelques mois à 2 ans), les micro-organismes peuvent proliférer sur ces zones vierges (effet direct). Et, là où les zones corallines peuvent subir des pressions potentielles comme la turbidité liée à l'activité portuaire ou la sédimentation accrue causée par les pluies diluviales lessivant les faciès ravalées peuvent à plus ou moins long terme affecter la santé des coraux et donc l'apparition de surfaces disponibles pour les micro-organismes (effet indirect).

Dès 2005, l'équipe de l'IRD de l'UMR 152 s'est penchée sur les risques potentiels liés à l'implantation des infrastructures en réalisant un suivi environnemental de différentes stations dans la baie de Prony et en recherchant plus particulièrement les populations microbiennes. De 2005 à 2007, ce suivi mensuel en saison chaude et tous les deux mois en saison fraîche n'a pas mis en évidence la présence de dinoflagellés (15 missions). En outre, aucune information formelle n'a été recueillie quant au risque ciguatérique par consommation des poissons pêchés dans la baie. D'après les populations locales, ces sites de pêche ne seraient pas connus pour être à risque (source des pêcheurs locaux).

I.3 Objectifs

Ouvéa et la baie de Prony sont des sites d'étude privilégiés, l'un pour évaluer la toxicité de population pisciaire reconnue indemne, l'autre pour analyser le devenir d'une population dans un milieu en cours de perturbation.

Ainsi, afin d'évaluer le risque ciguatérique pour chacun des sites d'études et en tenant compte des connaissances exposées dans le chapitre 2, les questions auxquelles devra répondre cette étude sont :

- Trouve-t-on des micro-organismes (micro-algues ou cyanobactéries) ciguatoxinogènes?
- Les poissons sont-ils ciguatoxiques ?
- Et si oui, quelle est l'ampleur du phénomène ?
- Dans la baie de Prony, la méthodologie étant établie en tenant compte des zones plus particulières à surveiller, l'impact anthropique entraîne-t-il des flambées ciguatériques ?

II. Matériels et méthodes

L'un des objectifs des travaux présentés dans ce chapitre est de mettre en place une méthodologie permettant le développement à plus long terme d'un plan de surveillance de la ciguatera en tenant compte des facteurs potentiels de risque mis en évidence. Ainsi, dans cette partie M et M, la méthodologie est décrite et les choix justifiés afin de répondre aux critères de faisabilité (technique, biologique) avec un compromis entre la valeur scientifique de l'étude et son coût financier.

II.1 Plan de suivi : zonation et fréquence

II.1.a Site d'Ouvéa

Une étude menée à Ouvéa par le programme Zoneco a permis de répertorier 72 familles et 675 espèces de poissons côtiers, parmi lesquelles 48 espèces n'étaient pas encore signalées en Nouvelle-Calédonie. L'inventaire ne tient pas compte des poissons des herbiers, des mangroves et du récif extérieur mais, à priori le nombre d'espèces côtières à Ouvéa reste inférieur à **1 000**. Les pêcheurs, selon la situation de tribu, interviennent majoritairement dans les Pléiades Nord, Pléiades Sud et dans le lagon. Ainsi, afin d'évaluer la toxicité des espèces pêchées, nous avons collecté un maximum d'espèces représentatives de celles qui sont habituellement consommées, dans les zones les plus fréquentées.

II.1.b Micro-organismes et poissons

Zones de suivi

Afin de couvrir les zones habituelles de pêche vivrière, cinq sites ont été définis (tableau 42 et figure 57) : le nord-est, le nord-ouest, le sud-est, le sud-ouest et le lagon. Les zones de prélèvements des micro-organismes (dinoflagellés et cyanobactéries) sont réparties sur l'ensemble de l'atoll en fonction de ces zones de pêche. Les points d'échantillonnage et leurs caractéristiques (coordonnées GPS, biotope, type de substrat) sont reportés en annexe 4 pour les deux missions d'observations en août 2007 et en mai 2008.

Tableau 42 : Définition des 5 sites regroupant les zones de pêches à Ouvéa

Sites	Code	Détails	« Lieu dit »
Nord Est	NE	District de St Joseph - Baie d'Ognat	Houlijeous, Ognat, Hoony
Nord Ouest	NW	Pléiades Nord	Ilôt de la Table, Wenvook
Sud Est	SE	District de Mouli	Mouli
Sud Ouest	SW	Pléiades Sud	Pléiades Sud, Ile de Sou
Lagon	LA	Zone lagon - plage	milieu lagon, wharf

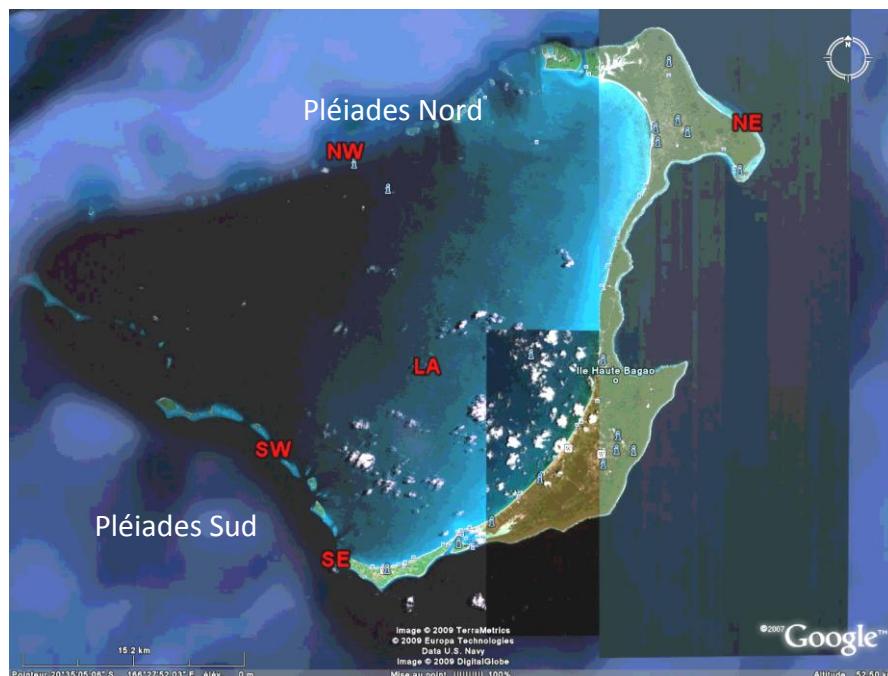


Figure 57 : Les 5 Sites de pêche à Ouvéa pour l'étude menée en septembre 2007.

Fréquence

Deux missions ont été menées en septembre 2007 et en mai 2008 : la première d'une semaine en fin de saison fraîche a permis de collecter les poissons et les populations de micro-organismes ciguatoxinogènes. La seconde de 3 jours en mai 2008, saison froide a eu pour but de suivre les populations de micro-organismes. Initialement prévue en saison chaude pour couvrir les deux saisons, celle-ci n'a pu avoir lieu en temps voulu pour des raisons logistiques.

Pour chacune des missions, la logistique sur place a été supportée par la Province des îles en faisant appel aux pêcheurs locaux, ceci permettant de tendre au maximum vers les habitudes de pêche.

II.1.c La baie de Prony

II.1.c.1 *Micro-organismes*

Zones de suivi

L'ensemble des sites de suivi des micro-organismes et des zones de collecte des poissons est reporté sur la carte marine (figure 58).

Les sites de prélèvements ont été sélectionnés en fonction de différentes particularités dans la baie de Prony et à l'extérieur (tableau 43) :

- Un site dans la baie de prony ne subissant aucune pression directe liée à l'usine : n°1,
- Quatre sites entourant les zones d'implantation des infrastructures portuaires : n°3, 4, 5, 6,
- Trois sites en baie du creek Nord, témoins de l'écosystème particulier de la baie, soumis aux apports d'eau douce et terrigènes de la rivière, mais ne subissant pas de perturbations directes liées au port : n°7, 8, 9,
- Trois sites dans la baie de Prony en zone extérieure : n°2, 10, 11,
- Trois sites extérieurs à la baie en face de Port Boisé, à quelques km de l'extrémité du tuyau : n°12, 13, 14.

Fréquence

Au vu des dynamiques des populations des micro-organismes, les sites de 1 à 9 sont suivis selon une fréquence mensuelle. Les prélèvements des sites n°10 à 14 sont effectués annuellement lors des collectes de poissons.

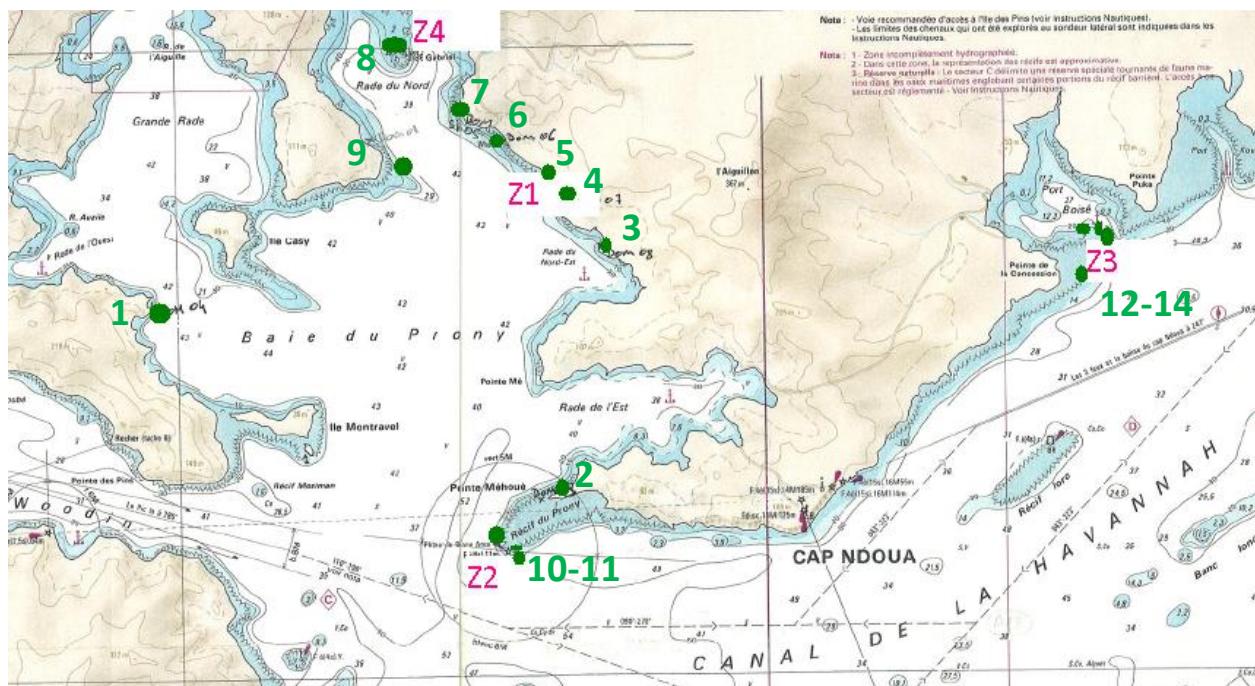


Figure 58 : Carte marine de la baie de Prony et du Canal de la Havannah : sites d'observations des micro-organismes (points) et zones de pêche (Z1 à Z4).

Tableau 43 : Site d'observation des micro-organismes : référence, nom et coordonnées GPS et zones de pêche correspondantes, référence et nom.

Site d'observation des micro-organismes			Zone de pêche	
Réf.	Nom	Coordonnées GPS	Réf.	Nom
1	Face à l'îlot Casy	S 22°21,980' E 166°49,782'	-	
2	Baie de Bonne Anse	S 22°23,285' E 166°53,515'	Z2	Bonne Anse
3	Face au port	S 22°21,551' E 166°53,772'	Z1	Port
4	Port	S 22°21,391' E 166°53,579'	Z1	Port
5	Tuyau	S 22°20,920' E 166°53,390'	Z1	Port
6	Vieux wharf	S 22°20,682' E 166°52,956'	Z1	Port
7	Plage	S 22°20,434' E 166°52,593'	Z4	Rade du Nord
8	Îlot Gabriel	S 22°19,993' E 166°52,124'	Z4	Rade du Nord
9	Rade Nord	S 22°20,694' E 166°51,888'	Z4	Rade du Nord
10	Bonne anse, extérieur	S 22°23,869' E 166°53,012'	Z2	Bonne Anse
11	Bonne anse, intérieur	S 20°23,700' E 166°52,928'	Z2	Bonne Anse
12	Port Boisé, passe extérieur	S 22°21,503' E 166°58,141'	Z3	Port Boisé
13	Port Boisé, passe récif extérieur	S 22°21,624' E 166°58,095'	Z3	Port Boisé
14	Port Boisé, passe Intérieur	S 22°21,437' E 166°58,072'	Z3	Port Boisé

II.1.c.2 Poissons

Zones de collecte

Trois zones ont été délimitées pour faire l'objet des suivis ciguatériques annuels des populations de poissons :

- Z1, au niveau du Port : « zone du Port »
- Z2, au niveau du récif Prony : « zone de Bonne Anse »
- Z3, à la pointe de la Conception, passe extérieure de Port Boisé : « zone de Port Boisé ».

Zone du port (Z1)

La zone de pêche est située sur une bande côtière de 100 m de large de part et d'autre des deux quais jusqu'à 15 m de profondeur. Entre 0 et 5 m, la zone est parsemée de pinacles coralliens puis au-delà de 5 m de substrat sableux. La zone peut subir d'importantes variations liées aux fortes pluies qui affectent notamment la salinité et les apports sédimentaires. Sur une partie du port, une zone d'endiguement dont la largeur reste limitée en bord de rive constitue la bande côtière (photo 96). Ces blocs rocheux affectent directement le paysage récifal en apportant des substrats nouveaux ; les digues peuvent perturber dans une certaine mesure l'hydrodynamisme côtier. Ce sont donc des zones dont l'évolution est surveillée.



Photo 96 : Zone de pêche du port Z1, vue de l'enrochement côtier.

Zone du récif Prony (Z2)

La zone de pêche Z2 est située à l'entrée de la baie de Prony au niveau de la baie de Bonne Anse. La pente externe est exclusivement constituée de structures coralliniennes riches et diversifiées. La pêche s'effectue jusqu'à 20 m de profondeur de part et d'autre de la pointe : côté extérieur et intérieur de la baie. Le récif est soumis à des courants et à des apports sédimentaires importants, particulièrement en marée descendante.

Zone de Port Boisé (Z3)

Cette zone de pêche est située au niveau de la passe extérieure droite (face à la côte) sur le récif plongeant rapidement de 5 à 32 m de profondeur. La zone est exclusivement corallienne. Au cœur du canal de la Havannah, le faciès est soumis à un fort hydrodynamisme et des apports sédimentaires potentiels provenant de la baie de Port Boisé.

Le tuyau rejette les effluents liquides traités en face de la baie de Kwé à 35 m de fond et à 4 km au large. La zone de pêche côtière ne subit donc pas directement de changement dans son paysage récifal.

Lors de la première année en 2008, trois individus ont été collectés sur une 4^{ème} zone (Z4) au niveau de l'îlot Gabriel en baie du Creek nord (Rade du Nord), mais le suivi ne s'est pas poursuivi afin de concentrer nos efforts sur les 3 zones définies.

Fréquence

Les poissons sont collectés une fois par an à la fin de la saison chaude. Ainsi, deux missions de prélèvement de poissons d'une durée d'une semaine ont eu lieu du 14 au 18 avril 2008 et du 20 au 24 avril 2009.

II.2 Echantillonnage et analyse des prélèvements

II.2.a Micro-organismes

Dinoflagellés

Le protocole de suivi des micro-organismes décrit dans le chapitre 2 (cf. ch2.II.2.b) est repris (Chinain *et al.*, 1999a). Sur chaque site suivi, deux prélèvements de macroalgues sont effectués. Dans un souci de comparaison, sur chaque site, la même algue support est collectée afin de se soustraire des éventuelles variabilités inter-hôtes. Chaque échantillon est stabilisé en solution de formaldéhyde à 5% en eau de mer filtrée à 0,45 µm.

En cas d'efflorescence importante de microalgues (i.e. plus de 1 000 cellules de dinoflagellés / g d'algue), une récolte plus abondante est effectuée en vue d'analyses toxicologiques.

Dans une optique d'utilisation de la méthode comme un outil de surveillance en baie de Prony, le suivi des micro-organismes de tous les sites peut se programmer en une journée.

Cyanobactéries

Lorsque des tapis cyanobactériens sont observés en grande quantité (surface > 2 m²), les cyanobactéries sont récoltées en quantité suffisante pour pouvoir évaluer leur potentiel toxique (conservation à -20° jusqu'au traitement d'extraction spécifique). Comme précédemment, pour chaque échantillon, trois prélèvements sont pratiqués en triplicat et conservés : i) stabilisé en

solution de formaldéhyde à 5% en vue de l'identification morphologique, ii) stabilisé à 50% en éthanol absolu pour les analyses moléculaires et iii) lyophilisé pour des analyses chromatographiques complémentaires.

Les espèces de dinoflagellés (genre *Gambierdiscus*, *Ostreopsis* ou *Prorocentrum*) et de cyanobactéries sont identifiées sur la base de critères morphologiques. Leurs protocoles d'extraction et d'analyse de toxicité (test souris, N2A et RBA) sont identiques à ceux décrits précédemment (cf. ch2.II.2.c).

II.2.b Poissons

II.2.b.1 Sélection des espèces dites sentinelles : méthode spécifique à la baie de Prony

Afin d'évaluer la toxicité de la chaîne pisciaire des trois zones suivies en baie de Prony, des espèces indicatrices de l'ampleur et de l'évolution du phénomène ciguatérique pour un temps donné ont été sélectionnées selon les critères suivants :

1) Trois régimes alimentaires différents (bas et haut de chaîne)

Des niveaux trophiques différents sont ciblés afin de connaître les variabilités inter-régimes alimentaires. La variabilité de la toxicité entre les niveaux inférieurs et supérieurs de la chaîne alimentaire pouvant donner des indications sur l'évolution du phénomène ciguatérique comme cela est décrit précédemment.

Nous ciblerons donc les herbivores, les molluscivores en bas de chaîne alimentaire et les carnivores aux niveaux supérieurs.

2) Espèces représentatives des sites sélectionnés

Les espèces ciblées doivent constituer la population qui se trouve majoritairement sur la zone afin de représenter au mieux la chaîne trophique associée à cet écosystème.

3) Espèces consommées par les populations

Le but final de l'étude étant d'un enjeu sanitaire, l'étude doit apporter des informations sur les espèces de poissons consommées par les populations. Les espèces ciblées sont donc des espèces pêchées pour la consommation.

4) Espèces présentes dans chacune des zones

Dans la mesure du possible, les espèces sélectionnées sont communes aux trois zones afin de pouvoir évaluer les variations spatiales. Ceci nous permet de nous soustraire de la variabilité interspécifique. En effet, le comportement alimentaire, le métabolisme, la physiologie propre d'une espèce leur confèrent des profils toxiniques pouvant être très variables (cf. ch.1.II.7.a.1). Les potentiels toxiques peuvent donc être différents.

5) Espèces présentes en nombre suffisant (n = 5).

Afin de valider un taux de toxicité par espèce, la collecte d'au moins cinq individus par espèce est nécessaire. Ce nombre tient compte des différents niveaux de variabilité identifiés dans la méthode : variabilité interindividuelle et variabilité liée à la méthode d'analyse (extraction, analyse par le test N2A). Le risque d'erreur sur le résultat est alors considéré acceptable pour le suivi. Il doit cependant être pris en compte pour le facteur risque définissant les marges de précaution pour déclencher une alerte. En outre, ce nombre est contraint à un maximum de spécimens pêchés en raison de la préservation de la ressource, du coût et du facteur temps (récolte, analyse de cytotoxicité).

Ainsi, sur chacune des zones et pour chaque campagne, nous ciblerons un minimum de 5 spécimens par niveau trophique, si possible appartenant à une même espèce, soit 15 poissons, constituant un total de 45 poissons à analyser (3 zones).

II.2.b.2 Analyse de la toxicité

La toxicité d'un poisson est évaluée sur la chair extraite selon le même protocole que celui utilisé pour l'analyse des poissons à Hunetë. L'analyse de l'extrait est menée à l'aide du test N2A. Répondant aux critères de sensibilité et de fiabilité, il permet une utilisation en routine pour évaluer le potentiel de ciguatoxicité de la zone d'étude. Pour rappel, son seuil de détection de l'ordre du **pg de toxines** est inférieur aux teneurs en toxines minimales estimées pour déclencher les premiers symptômes ciguatériques chez l'Homme qui sont de l'ordre de 0,1 ng / g de chair (Hamilton et al., 2009). Certes, cette valeur est discutable selon la sensibilité des personnes et selon la quantité de toxines qu'elles ont éventuellement accumulé mais elle correspond à un niveau de précaution pour évaluer la sensibilité d'un test utilisable dans le cadre d'une veille sanitaire.

Aussi, toujours dans l'optique de son utilisation en routine, il a également été choisi pour ses avantages techniques présentés en chapitre 1. Nous retiendrons ici, les techniques de laboratoire relativement simples de culture associées à une extraction rapide qui permettent le criblage de la toxicité de nombreux spécimens de poissons de manière sensible et fiable en un temps relativement rapide.

Le test N2A tel qu'il a été décrit précédemment, est quelque peu modifié afin de l'adapter à un usage en routine. Les changements concernent (i) le nombre de concentrations testées et donc la répartition des extraits en microplaques et (ii) la classification des toxicités.

Schéma de plaque utilisé

La fraction F2 (90 : 10) issue de l'extraction de 5 g de chair de poisson permet de tester une gamme de concentrations de 156 ; 313 ; 625 µg éqv de chair / mL au minimum en duplicate et chaque concentration est testée en triplicat ($N = 2 \times 3$). Pour chaque plaque, trois concentrations de PbTx-3 permettent de contrôler la réponse cellulaire : 10 ; 35 ; 140 nM ($n = 2$) par comparaison aux courbes de calibration. Les tests sont validés par différents contrôles

(cellules seules, n = 9 ; cellules avec OV, n = 9 ; gamme de 3 concentration de PbTx-3, n = 2). La spécificité de la toxicité pour les CSSP est validée par l'effet des extraits avec et sans OV.

La répartition des différentes conditions (témoins, gammes de concentrations des poissons (ex. du poisson n°1 : P1 avec et sans OV : P1+OV et P1-OV à 3 concentrations (a, b et c)) est établie selon le schéma de plaque représenté en figure 59. Deux poissons sont testés par plaque.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		MS										PbTx3a + OV
C		OV										
D		P1a - OV		P1b - OV		P1c - OV						PbTx3b + OV
E		P1a + OV		P1b + OV		P1c + OV						
F		P2a - OV		P2b - OV		P2c - OV						PbTx3c + OV
G		P2a + OV		P2b + OV		P2c + OV						
H												

Figure 59 : Schéma de plaque pour l'analyse de toxicité des poissons (Test N2A) : exemple donné pour le test des poissons P1 et P2 à 3 concentrations (a, b et c ; n = 3) avec et sans OV (+OV et -OV) ; les témoins sont les cellules seules (MS ; n = 9), les cellules seules en présence d'OV (OV ; n = 9) et les cellules en présence d'OV et de la PbTx-3 à 3 concentrations (PbTx-3 +OV ; n= 2) .

Calibration et classes d'activité toxique

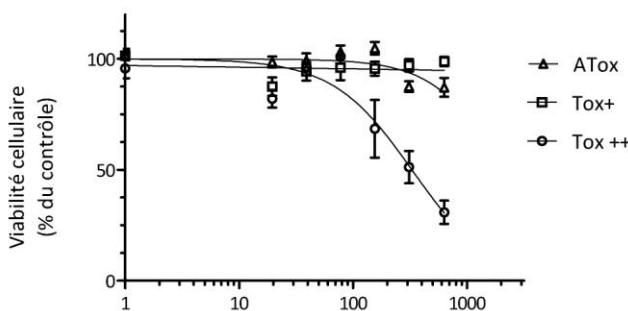
Jusqu'à présent, la toxicité d'un extrait avait été exprimée en Cl_{50} . Afin de caractériser le potentiel toxique d'un poisson dans le cadre d'un usage en routine du test N2A, nous leur attribuons des degrés d'activité toxique déterminés grâce à l'activité de poissons « témoins » qui ont permis de calibrer le test N2A. Le tableau 44 présente les poissons herbivores (Scaridés) et carnivores (Serranidés) utilisés pour la calibration et leur toxicité évaluée par les tests souris et RBA réalisés à l'ILM. Pour le test RBA, la toxicité des poissons est classée selon trois groupes, les atoxiques pour les valeurs inférieures à 0,31, Tox+ pour les valeurs entre 0,31 et 0,8 et Tox++ pour les valeurs supérieures à 0,8.

Dans les conditions du test N2A, nous avons testé une gamme de 6 concentrations de 40 à 1 250 µg éqv de chair / mL afin d'évaluer l'effet cytotoxique de ces poissons (figure 60, a herbivores et b, carnivores) et ainsi de calculer leur Cl_{50} dans nos conditions d'expérimentation (tableau 45).

Tableau 44 : Caractéristiques des poissons « témoins » utilisés et valeurs de toxicité obtenues à l'aide des tests souris et RBA réalisées à l'ILM.

Régime alimentaire	Origine	Nom commun	Poids (kg)	Taille (cm)	Test souris US/g	Test RBA équiv ng P-CTX-3C /g de chair	Conclusion du test RBA
Herbivore	Raivavae (PF)	perroquet	1,9	48	-	5,58	Tox ++
			2,2	46	-	0,56	Tox +
			2,7	52	-	< 0,31	ATox
Carnivore	Moruroa (PF)	loche saumonée	13,0	-	2	2,64	Tox ++
			8,0	-	0,20	0,95	Tox ++
			20,0	110	< 0,1	< 0,31	ATox

a) Témoin, poissons herbivores



b) Témoin, poissons carnivores

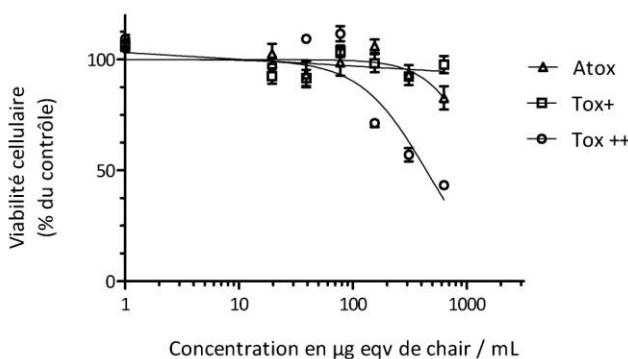


Figure 60 : Courbes de cytotoxicité du test N2A des poissons « témoins » : a, poissons de régime herbivore et b, poissons de régime carnivore (n = 3).

Les herbivores et les carnivores atoxiques et toxiques en test RBA n'ont pas montré de toxicité dans la gamme de concentrations testées (maximum de 1 250 µg équiv de chair / mL). Les

herbivores et les carnivores Tox ++ ont révélé une toxicité spécifique des CSSP ($p < 0,001$) dont les Cl_{50} calculés sont de 327 et 439 µg éqv de chair / mL respectivement (tableau 45).

Tableau 45 : Valeurs de Cl_{50} des poissons « témoins » obtenus par le test N2A dans nos conditions expérimentales.

	Herbivores (Perroquet)		Carnivores (Saumonée)	
	Cl_{50} (µg éqv de chair / mL)	Coefficient de Hill	Cl_{50} (µg éqv de chair / mL)	Coefficient de Hill
Atoxique	> 1250	ND	> 1250	ND
Tox+	> 1250	ND	> 1250	ND
Tox++	327 ± 96	-1,2	439 ± 121	-1,5

Ainsi, d'après les valeurs de Cl_{50} évaluées pour les poissons de calibration, associées à la valeur de toxicité définie pour l'Homme qui est de **540 µg éqv d'extrait / mL** (cf. chap II.3.c.3.b), nous avons défini une gamme propre de toxicité comprenant trois classes de toxicité : (i) non toxique (atoxique), (ii) moyennement toxique (Tox+) et (iii) fortement toxique (Tox++) au-delà du seuil symptomatique chez l'Homme. Le tableau 46 décrit ces 3 classes en prenant en compte les valeurs de la cytotoxicité obtenues pour 313 µg de chair/ mL.

Tableau 46 : Classes de toxicité des poissons attribuées par le test N2A, par évaluation des valeurs de cytotoxicité provoquées par 313 µg eqv de chair / mL : Atoxique (Atox), moyennement toxique (Tox+) et fortement toxique (Tox++).

Classe de toxicité	Code	Viabilité cellulaire à 313 µg eqv de chair / mL
Atoxique	ATox	> 80 %
Moyennement toxique	Tox +	[50% – 80%]
Fortement toxique	Tox ++	< 50%

III. Résultats

III.1 Site d'Ouvéa

III.1.a Micro-organismes

III.1.a.1 Récolte

En août 2007, 33 sites ont été prospectés et 44 échantillons d'algues ont été prélevés et analysés (figure 61). En mai 2008, début de la saison fraîche, 23 échantillons d'algues et de

coraux branchus ont été prélevés pour l'observation de la microflore associée. Sur certains sites, des mattes de cyanobactéries ont été observées (photo 97), constituant pour certaines de larges couvertures (surface > 2 m²) (tableau 47).

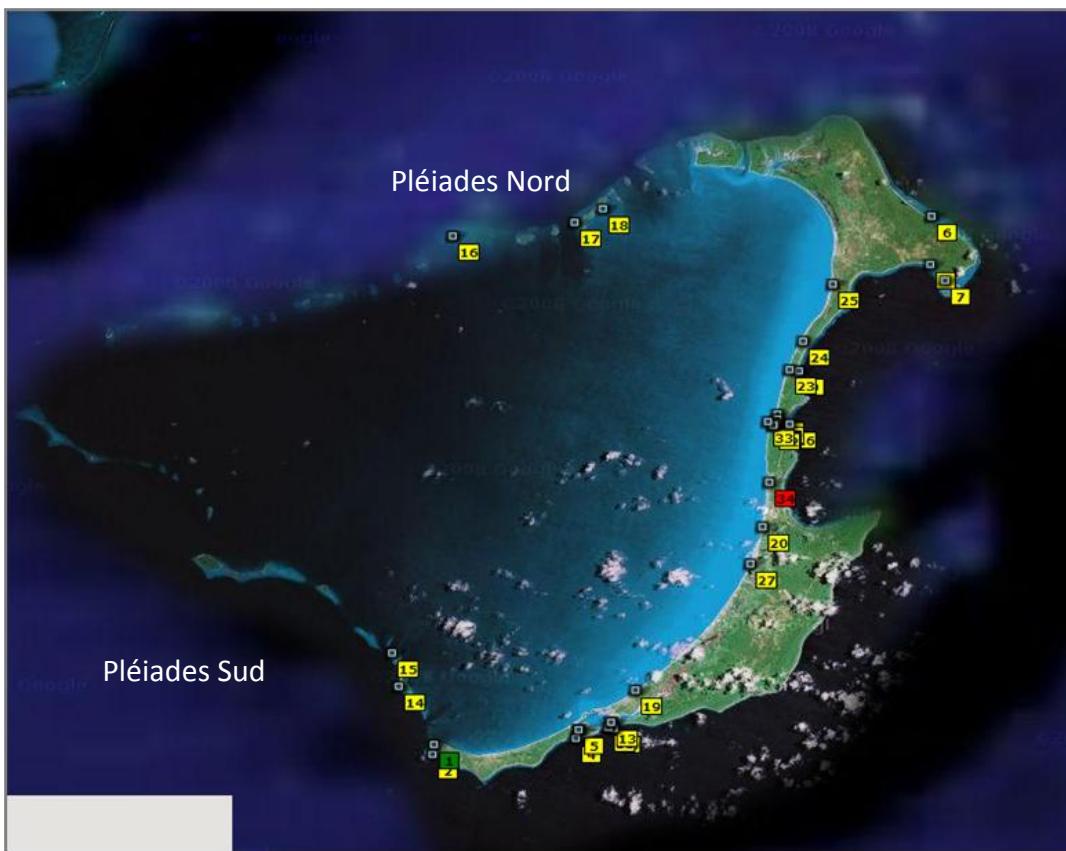


Figure 61 : Points d'observations des micro-organismes à Ouvéa (08/2007 et 05/2008).

Tableau 47 : Points de prélèvement de cyanobactéries observées sous forme de mattes (surface > 2 m²).

Date	Site	Zone	Lieu dit	Coordonnées GPS	Type de fond	Type de prélèvement
2007/08/27	SE	C01	Mouli	20°42'59.28" S 166°23'26.20"E	platier	cyanobactéries filamentueuses
2007/08/27	SE	C02	Passe de la Calédonie	20°42'30.15" S 166°27'50.36"E	sableux + corail	cyanobactéries filamentueuses
2007/08/28	SE	C09	Passe de Lifou	20°42'17.19" S 166°28'51.43"E	sable	cyanobactéries filamentueuses
2007/08/29	NW	C12	Angeu	20°27'07.95" S 166°24'01.20"E	sable	cyanobactéries filamentueuses en support sur <i>Halimeda</i>
2007/08/30	LA	C24	milieu lagon	20°42'180" S 166°24'970"E	sable	cyanobactéries filamentueuses
2007/08/30	LA	C25	milieu lagon, plateau	20°42'180" S 166°24'970"E	sable	cyanobactéries filamentueuses

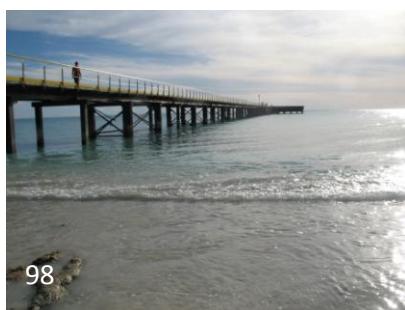


Photo 97 : Exemple de cyanobactéries observées à Ouvéa en août 2007, Pléiades Nord à Angeu (C12).

III.1.a.2 Données d'observations

Août 2007

La présence de dinoflagellés n'a pas été relevée sur l'ensemble des points d'observations ; à l'exception de cellules de *Gambierdiscus* observées sur le site Wadrilla (photo 98) : prélèvements référencés C16 à C18, C21, C28 à C30 et C32 ($n < 50$ cellules/g d'algues). Les Rhodophycées prélevées près du quai de Wadrilla sont identifiées comme *Digenea simplex* (photos 99 et 100). Elles sont présentes en bord de plage et constituent le support majoritaire des *Gambierdiscus* observés.



98



99



100

Photos 98, 99, 100 : Quai de Wadrilla (98), site de prélèvement de *Digenea simplex* (99), support des cellules de *Gambierdiscus* observées au microscope optique (100) (diamètre $\approx 60\mu\text{m}$).

L'espèce de *Gambierdiscus* n'a pas été identifiée. Naturellement présent dans les écosystèmes, ce genre peut constituer un risque avéré si l'espèce est reconnue toxinogène et trouve des facteurs favorables à un développement en masse pouvant contaminer la chaîne trophique.

Les cyanobactéries filamentées benthiques appartiennent à l'ordre des Oscillatoriiales, elles ont été rencontrées à Lifou et ont fait l'objet de tests de toxicité. Deux prélèvements de cyanobactéries (C02 et C09) ont été collectés en quantité suffisante pour permettre des analyses préliminaires. Elles ont été identifiées morphologiquement : la population C02 est constituée majoritairement de *Phormidium cf. laysanense* (photos 101 et 102) et celle collectée en C09 d'*Hydrocoleum cf. lyngbyaceum* associée à *H. glutinosum* (photos 103 et 104).



Photos 101, 102 : Tapis de cyanobactéries observés à Ouvéa en août 2007, Passe de la Calédonie dit chenal de Fayawa (C02).



Photos 103 et 104 : Tapis de cyanobactéries observés à Ouvéa en août 2007, Passe de Lifou, au pied des falaises de Lékiny (C09).

Mai 2008

Sur les 23 prélèvements effectués pour l'observation des micro-organismes en mai 2008, la présence de cellules de *Gambierdiscus* n'a été observée sur aucun des sites échantillonnés. Nous n'avons pas de recul sur l'ensemble de la saison pour vérifier leur présence lorsque les températures leur sont favorables. Malheureusement, la deuxième mission prévue initialement en période chaude en début d'année 2008, n'a pu avoir lieu. Menée à la fin du mois de mai, la température s'était déjà nettement rafraîchie.

Les tapis de cyanobactéries de la zone de Lekiny (pied des Falaises et passe de Fayawa) sont toujours présents.

III.1.a.3 Analyse de toxicité des cyanobactéries

Des analyses préliminaires ont été menées uniquement en test souris sur les fractions hydrosolubles des mattes de cyanobactéries dominées par *P. cf. laysanense* (C02) et *H. cf. lyngbyaceum* et *H. glutinosum* (C09). Les rendements d'extraction sont pour les fractions hydrosolubles de 2,17% et 2,25% par rapport à la masse lyophilisée extraite.

Test Souris

Les extraits hydrosolubles des mattes de cyanobactéries collectées dans les Passes de la Calédonie et de Lifou sont analysés par test souris. Ces 2 mattes, C02 et C09 dominées par *P. cf. laysanense* et *H. cf. lyngbyaceum*, ont montré de fortes toxicités dont les DL₅₀ respectives sont estimées à **2,5 et 4,0 mg d'extrait par g de souris**. Les symptômes sont similaires à ceux observés pour les mattes d'Oscillatoiales collectées à Lifou : les souris injectées démontrent des paralysies sévères provoquant la mort par détresse respiratoire.

III.1.b Poissons

III.1.b.1 Récolte

Un total de 90 poissons ont été pêchés durant la mission d'août 2007. Le tableau en annexe 5 résume l'ensemble des données : le site, la zone de collecte, et l'identification. Les détails biométriques y sont également reportés (longueur à la fourche et poids du poisson). Les planches photo sont également en annexe 5.

Le tableau 48 montre la variété d'espèces collectées classées par sites : 40 espèces différentes ont été collectées. L'objectif est de tendre vers une population d'individus représentative des poissons pêchés par les pêcheurs locaux tant en diversité d'espèce qu'en taille.

Les différents régimes trophiques rencontrés sont les herbivores, les poissons se nourrissant essentiellement d'invertébrés benthiques, les omnivores, les zooplanctonophages et les carnivores. La répartition des poissons collectés selon leur régime alimentaire et les sites est représentée en figure 62.

Tableau 48 : Poissons pêchés à Ouvéa en septembre 2007 : nombre de spécimens par espèce et par site de collecte rangés par ordre croissant de niveau trophique.

SITE	Espèce	Total	SITE	Espèce	Total
LA (lagon)	<i>Acanthurus blochii</i>	1	SE (sud-Est)	<i>Chlorurus microrhinos</i>	1
	<i>Chlorurus microrhinos</i>	2		<i>Epinephelus cf. maculatus</i>	1
	<i>Scarus ghobban</i>	1		<i>Epinephelus polyphekadion</i>	1
	<i>Scarus oviceps</i>	1		<i>Lutjanus bohar</i>	1
	<i>Lethrinus nebulosus</i>	3		<i>Plectropomus laevis</i>	1
	<i>Platax sp.</i>	1		Total SE	
	<i>Plectrorhincus chaetodonoides</i>	2		<i>Acanthurus blochii</i>	1
	<i>Pseudobalistes fuscus</i>	2		<i>Acanthurus dussumieri</i>	3
	<i>Sufflamen sp</i>	1		<i>Naso tonganus</i>	1
	<i>Aprion virescens</i>	1		<i>Scarus altipinnis</i>	1
	<i>Epinephelus cyanopodus</i>	3		<i>Scarus ghobban</i>	2
	<i>Epinephelus maculatus</i>	3		<i>Carangoides ferdau</i>	1
	<i>Plectropomus laevis</i>	2		<i>Carangoides orthogrammus</i>	1
	<i>Sphyraena flavicauda</i>	2		<i>Lethrinus rubrioperculatus</i>	2
Total LA		25		<i>Macolor niger</i>	1
NE (nord – est)	<i>Cetoscarus bimaculatus</i>	1	SW (sud - ouest)	<i>Plectrorhincus lineatus</i>	2
	<i>Chlorurus microrhinos</i>	4		<i>Epinephelus maculatus</i>	1
	<i>Scarus altipinnis</i>	2		<i>Epinephelus polyphekadion</i>	2
	<i>Siganus cf. vermiculatus</i>	2		<i>Epinephelus sp.</i>	1
	<i>Siganus punctatus</i>	4		<i>Lutjanus bohar</i>	1
	<i>Siganus spinus</i>	1		<i>Plectropomus leopardus</i>	2
	<i>Gnathodentex aureolineatus</i>	1		<i>Variola louti</i>	1
	<i>Kyphosus sp.</i>	1		Total SW	
	<i>Monotaxis grandoculis</i>	1			
	<i>Cephalopholis argus</i>	1			
	<i>Epinephelus cf. maculatus</i>	1			
	<i>Plectropomus laevis</i>	2			
	<i>Trachinotus blochii</i>	1			
Total NE		22			
NW (nord - ouest)	<i>Acanthurus dussumieri</i>	2			
	<i>Chlorurus microrhinos</i>	2			
	<i>Naso tonganus</i>	1			
	<i>Naso unicornis</i>	1			
	<i>Scarus niger</i>	1			
	<i>Siganus punctatus</i>	1			
	<i>Macolor niger</i>	1			
	<i>Plectrorhincus chaetodonoides</i>	1			
	<i>Epinephelus maculatus</i>	1			
	<i>Gymnothorax javanicus</i>	1			
	<i>Plectropomus laevis</i>	3			
Total NW		15			

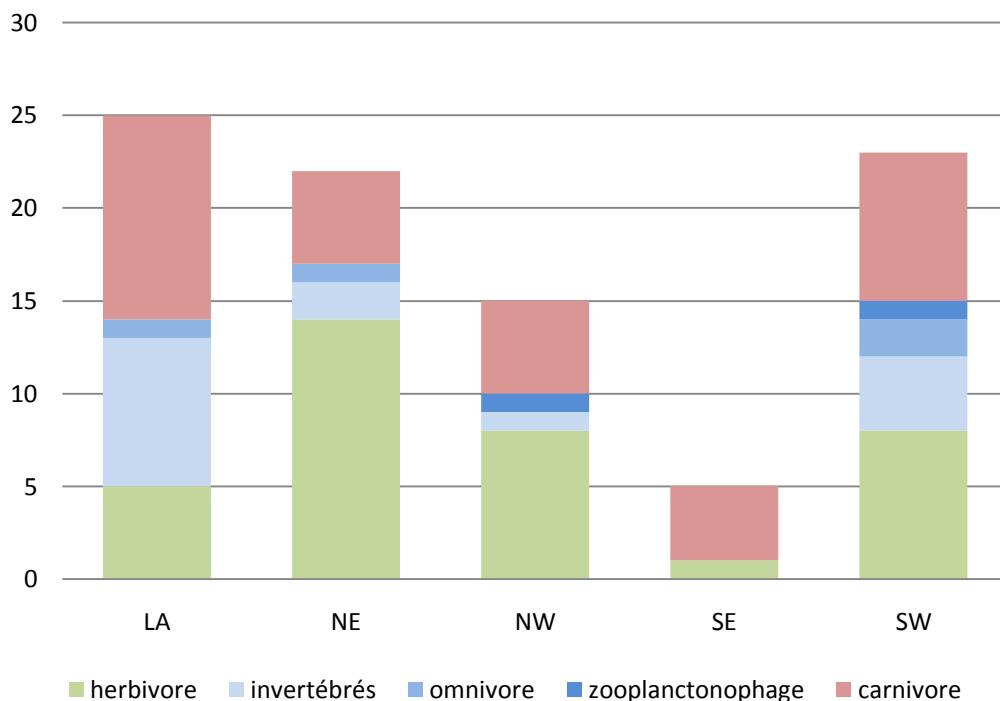


Figure 62 : Poissons pêchés à Ouvéa en septembre 2007 : nombre de spécimens par régime trophique et par site de collecte.

III.1.b.2 Analyses toxicologiques, Test N2A

Sur l'ensemble de la récolte de poissons

La répartition des spécimens pisciaires analysés par classe de toxicité définie précédemment est résumée dans le tableau 49. Sur les 90 poissons testés, 84% n'ont pas montré de cytotoxicité (Atox), 1% avec une faible toxicité (Tox +) et 14% sont fortement toxiques (Tox ++).

Tableau 49 : Nombre d'individus par classe de toxicité évalué par le test N2A des poissons pêchés à Ouvéa en septembre 2007.

Classe de toxicité	Nb d'individus	%
ATox	76	84
Tox +	1	1
Tox ++	13	14
Total général	90	

Afin de faciliter l'interprétation, étant donné le nombre important d'espèces identifiées, nous avons regroupé les données de toxicité par poissons selon leur nom vernaculaire.

Différence selon le nom vernaculaire et le niveau trophique

La figure 63 représente le nombre d'individu par classe de toxicité Tox+ et Tox++ ou atoxique (ATox) selon le nom vernaculaire et le régime trophique : herbivore, « divers » (zooplanctonophage, mangeur d'invertébrés benthiques, omnivore) et carnivore.

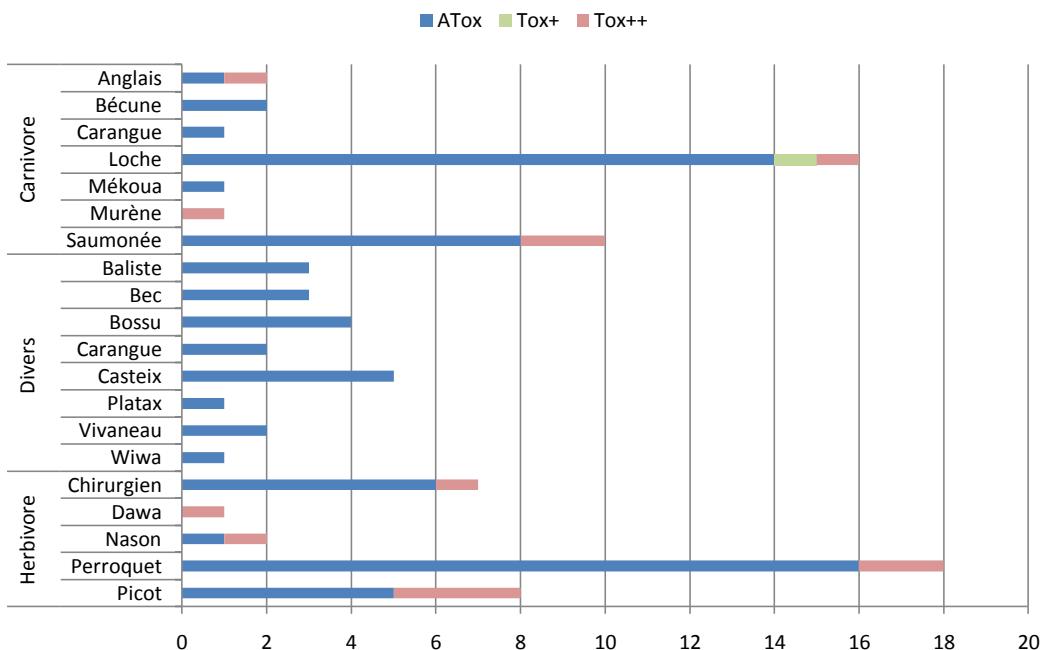


Figure 63 : Cytotoxicité des poissons collectés à Ouvéa en 2007 selon les noms vernaculaires classés par niveau trophique : herbivore, « divers » (zooplanctonophage, mangeur d'invertébrés benthiques, omnivore) et carnivore.

Sur l'ensemble de la collecte, nous ne pouvons conclure quant au statut toxique d'une « espèce » que pour celles dont le nombre de spécimens collectés est suffisant ($n > 5$). Nous pouvons citer les loches dont 88% sont Atox (*Epinephelus* spp., $n = 16$), les saumonées dont 80% sont Atox (*Plectropomus* spp., $n = 10$) et les perroquets dont 81% sont Atox (*Scarus* spp. ou *Chlorurus* spp., $n = 18$). Les effectifs des autres « espèces » collectées est trop faible pour pouvoir conclure quant à leur niveau de toxicité par « espèce ».

La toxicité par espèce est inférieure à 20% (moyenne $\approx 17\%$) et touche indifféremment les herbivores (perroquet) et les carnivores (loches et saumonée). En outre, il est intéressant de noter la forte cytotoxicité induite par l'extrait de murène (*Gymnothorax javanicus* ; $n = 1$).

Variabilité spatiale et régimes trophiques

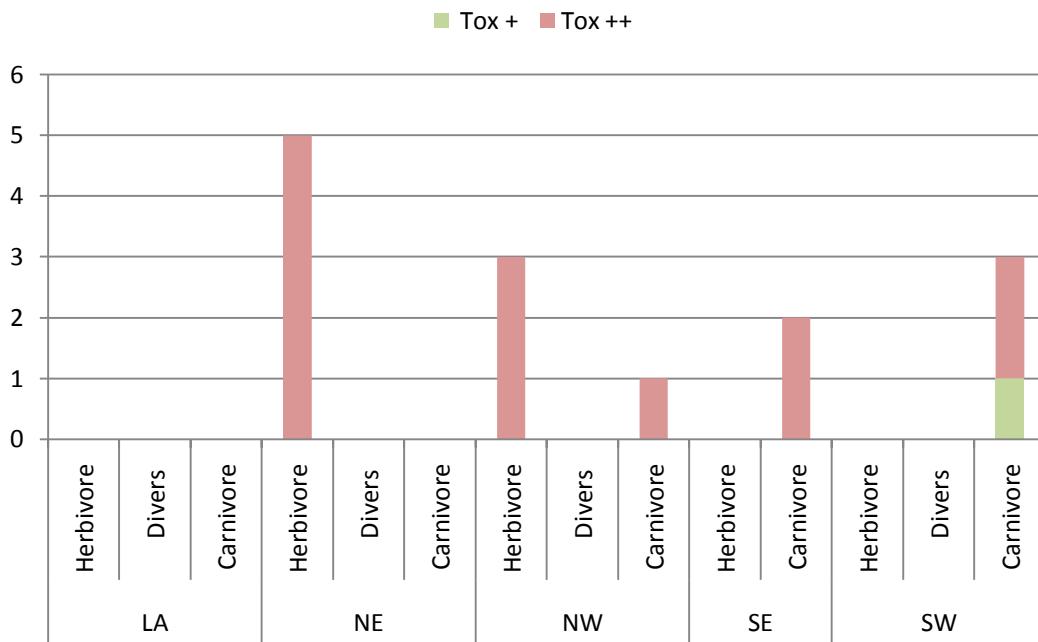


Figure 64 : Cytotoxicité des chairs de poissons en fonction du régime alimentaire et de la zone de pêche

En ce qui concerne les zones de pêche, toutes présentent quelques individus toxiques (Tox++, majoritairement) à l'exception de la zone lagunaire (figure 64). Exceptée cette zone (LA), pour les zones de pêche où le nombre de spécimens péchés est supérieur à 5, la moyenne de poissons toxiques est de 4 individus par site (zones NE, NW et SW) et elles ne présentent pas de degré de toxicité différent ($p > 0,05$).

Les résultats sur les proportions d'individus ne montrent donc pas de différence entre les zones où des poissons sont toxiques et la zone du lagon présenterait moins de risque ciguatérique (aucun poisson toxique, n = 25).

Les résultats de toxicité ne révèlent pas de différences significatives entre les poissons selon leur régime alimentaire. On peut noter cependant : (i) qu'aucune toxicité n'a été montré pour les poissons omnivores, les zooplanctonophages et ceux qui se nourrissent d'invertébrés (Classe « Divers ») et que (ii) les brouteurs et les herbivores pourtant réputés non toxiques par la population (perroquet, picot ou chirurgien), peuvent révéler une certaine toxicité.

Différence de taille et de poids

Le nombre d'individus classés Tox+ et Tox++ par rapport à la totalité des individus péchés par espèces de poissons (nom vernaculaire) est réparti par classe de taille et classes de poids (figures 65 et 66 respectivement). Le poids moyen des individus est de $1,94 \pm 0,98$ kg et la taille moyenne est de 44 ± 12 cm (sans la murène). Les individus les plus gros (en taille et en poids) sont les saumonées et la murène péchées en dehors du lagon aux Pléiades Nord (NW) et

Sud (SW). La toxicité touche donc indifféremment les poissons selon leur taille ($p = 0,117$) et leur poids ($p = 0,352$).

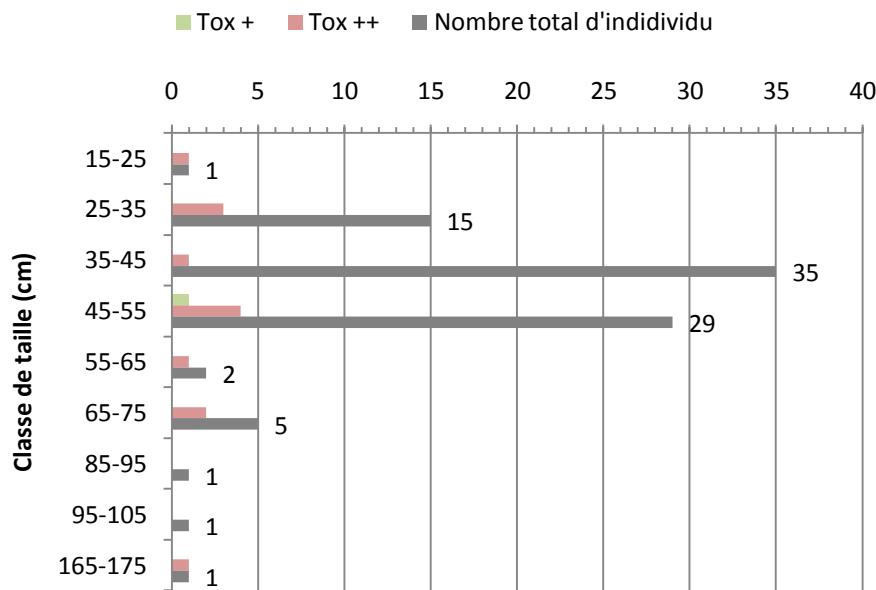


Figure 65 : Nombre de poissons cytotoxiques par classe de taille (cm)

Ces résultats ne montrent pas de corrélation entre la toxicité d'un individu et son poids ou sa taille. Pour évaluer ces deux critères, il faudrait effectuer un échantillonnage plus complet en termes de distribution de poids et de taille de population ainsi qu'en termes de nombre d'individu par espèce. Il serait aussi intéressant de comparer la toxicité d'un poisson en fonction de son âge par l'étude de ses otolites.

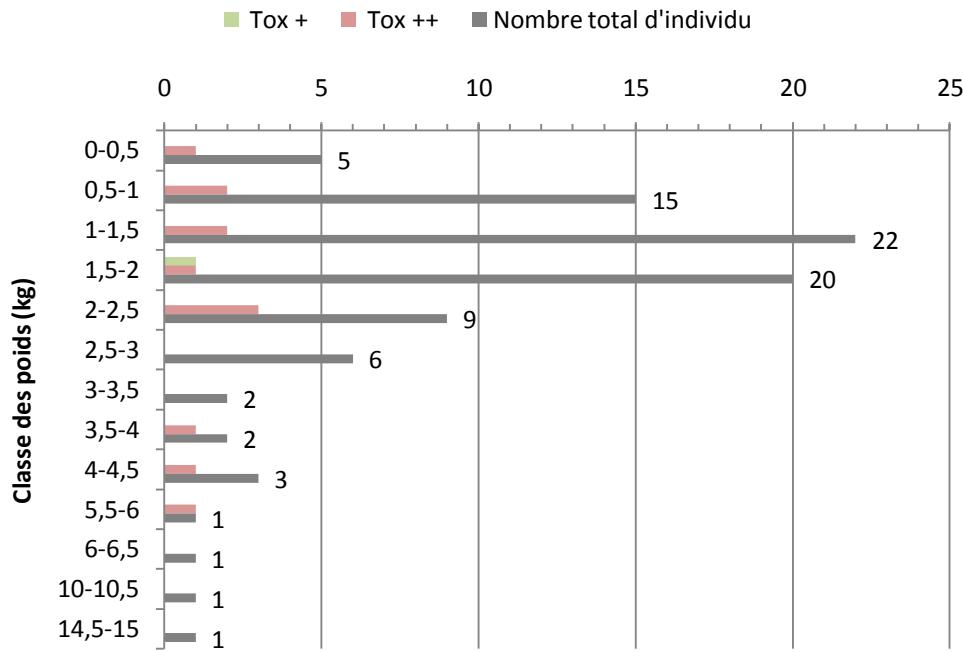


Figure 66 : Nombre de poissons cytotoxiques par classe de poids (kg)

III.2 Site de Prony

III.2.a Paramètres physico-chimiques

Température

A chaque mission mensuelle, les températures de surface sont relevées sur les sites d'observation des micro-organismes (figure 67). Les données enregistrées de variations de températures, de minima et de maxima, ne révèlent pas d'anomalies de température. En outre, elles sont plus favorables au développement des dinoflagellés du genre *Gambierdiscus* en saison chaude (décembre à avril), T°C = [27 à 31 °C].

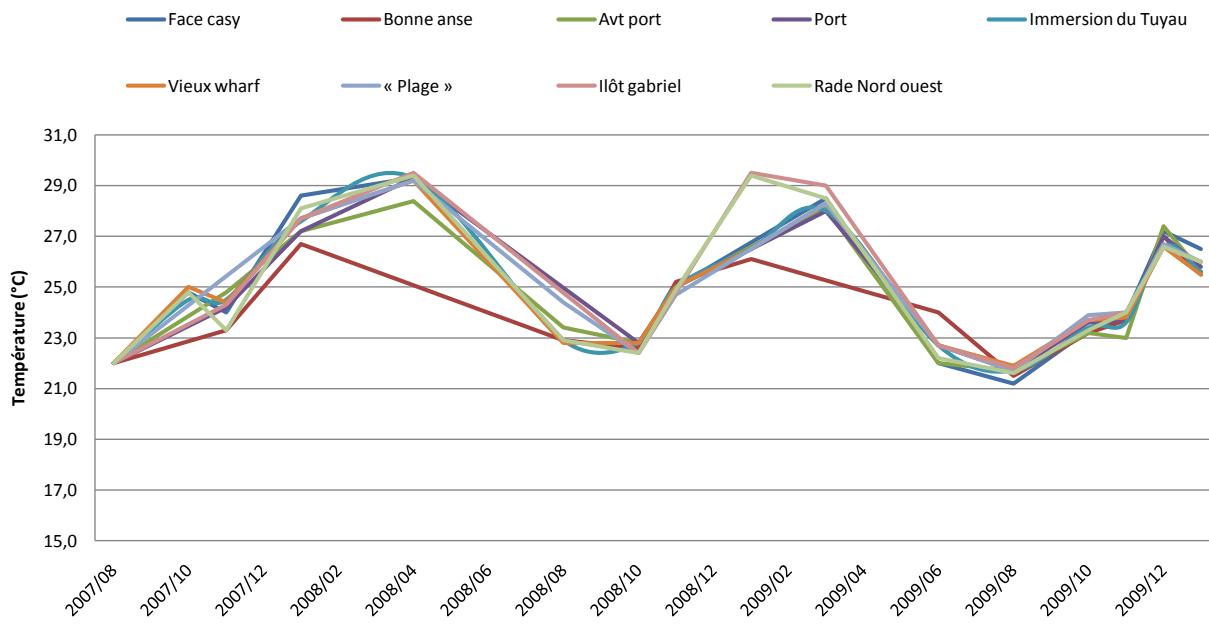


Figure 67 : Valeurs des températures des stations de suivi des micro-organismes.

Données sels nutritifs – pH

Des analyses physico-chimiques sont effectuées par l'IRD pour Vale sur différents sites dans la baie de Prony et en dehors de la baie. Le tableau 50 recueille les données de mars 2007 et août 2008 disponibles pour les stations du Port de Prony, de Port Boisé, de la Baie Nord et de l'îlot Casy.

Ces données mettent en évidence les différences de paramètres entre la saison chaude et la saison fraîche. Cependant, pour une même période, il n'y a pas de différence majeure entre les stations, à l'exception de plus importantes teneurs en apports azotés en relevé de surface, en août 2008 dans la Baie Nord.

Tableau 50 : Analyses physico-chimiques des stations du Port de Prony, de Port Boisé, de la Baie Nord et de l'îlot Casy effectuées en mars 2007 et août 2008.

		Port de Prony		Port Boisé		Baie Nord Embouchure creek		Ilôt Casy	
		2007/03	2008/08	2007/03	2008/08	2007/03	2008/08	2007/03	2008/08
		Surface	Mi-profondeur	Fond					
Température (°C)	Surface	26,69	22,22	26,53	22,61	26,76	22,32	26,42	22,26
	Mi-profondeur	26,39	22,05	26,45	22,61	26,42	22,14	26,49	22,18
	Fond	25,37	21,96	25,61	22,61	25,78	21,95	25,99	21,93
Turbidité (FTU)	Surface	0,376	1,294	0,258	1,225	0,226	1,396	0,327	1,323
	Mi-profondeur	0,348	1,288	0,405	1,237	0,469	1,27	0,262	1,289
	Fond	1,499	1,531	0,295	1,286	5,893	1,468	0,863	1,888
Nitrates et nitrites ($\mu\text{mol/L}$)	Surface	0,032	0,084	0,099	0,038	1,212	0,011	0,041	0,102
	Mi-profondeur	0,028	0,019	0,037	0,032	0,052	0,006	0,019	0,098
	Fond	0,099	0,016	0,13	0,059	0,032	0,016	0,049	0,106
Phosphate ($\mu\text{mol/L}$)	Surface	0,027	0,017	0,031	0,036	0,014	0,01	0,024	0,019
	Mi-profondeur	0,036	0,019	0,018	0,039	0,04	0,014	0,029	0,039
	Fond	0,058	0,024	0,023	0,036	0,053	0,025	0,051	0,019
Cr ($\mu\text{g/L}$)	Surface	0,111	-	0,085	-	0,104	-	0,136	-
	Mi-profondeur	0,126	-	0,071	-	0,095	-	0,052	-
	Fond	0,087	-	0,107	-	0,049	-	0,126	-
Mn ($\mu\text{g/L}$)	Surface	0,29	0,28	0,23	0,11	0,43	0,45	0,29	0,24
	Mi-profondeur	0,19	0,27	0,19	0,12	0,2	0,26	0,23	0,23
	Fond	0,24	0,25	0,22	0,1	0,17	0,24	0,2	0,26
Masses de particules (mg/L)	Surface	-	0,5	-	0,5	-	-	-	0,5
	Mi-profondeur	-	0,5	-	0,5	-	0,6	-	0,2
	Fond	-	0,5	-	0,5	-	0,2	-	0,3

III.2.b Micro-organismes

III.2.b.1 Récolte et observations

Dinoflagellés

Le suivi de 2007 à 2010 des populations de micro-organismes épiphytiques des 14 sites est résumé dans le tableau 51. La concentration moyenne de cellules de *Gambierdiscus* est exprimée en nombre de cellules par mL. Nous rappelons qu'une concentration de 1 000 cellules / g d'algues supports traduit un stade d'efflorescence (Chinain *et al.*, 1999a). Pour chaque prélèvement, les algues sont du genre *Turbinaria* (Phéophycée) ou du genre *Halimeda* (Chlorophycée) à l'exception des sites 10, 11, 12, 13 suivis annuellement lors de la campagne de pêche pour lesquels les supports sont des débris coralliens. En effet, ces 5 sites situés en pente externe ne présentent aucune macroalgue support potentiel des dinoflagellés benthiques.

Tableau 51 : Données d'observations par sites des prélèvements de micro-organismes épiphytiques à Prony depuis 2007 : 0 : absence de cellules de dinoflagellés et nombre de cellules de *Gambierdiscus* spp. / g d'algues ; case vertes : présence de trichomes de cyanobactéries.

		Baie de Prony				Port			Bonne Anse				Port Boisé		
		1	7	8	9	3	4	5	6	2	10	11	12	13	14
		Casy	Plage	Îlot Gabriel	Rade Nord	Face au port	Port	Tuyau	Vieux wharf	Baie	Ext.	Int.	Passe ext.	Passe récif	Passe Int.
2007	Août	P14	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-
	Octobre	P15	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-
	Novembre	P16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2008	Janvier	P17	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-
	Avril	P18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mai	P19	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-
	Juin	P20	0	0	0	0	0	< 50	0	0	-	-	-	-	-
	Août	P21	0	0	0	0	0	0	0	< 50	0	-	-	-	-
	Octobre	P22	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-
	Novembre	P23	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-
	Décembre	P24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
2009	Janvier	P25	0	-	0	0	0	-	-	0	-	-	-	-	-
	Mars	P26	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-
	Avril	P27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Juin	P28	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-
	Août	P29	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-
	Octobre	P30	< 50	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-
2010	Novembre	P31	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-
	décembre	P32	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-
	janv-10	P33	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-
	févr-10	P34	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-
	avr-10	P35	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-
	mai-10	P36	< 50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

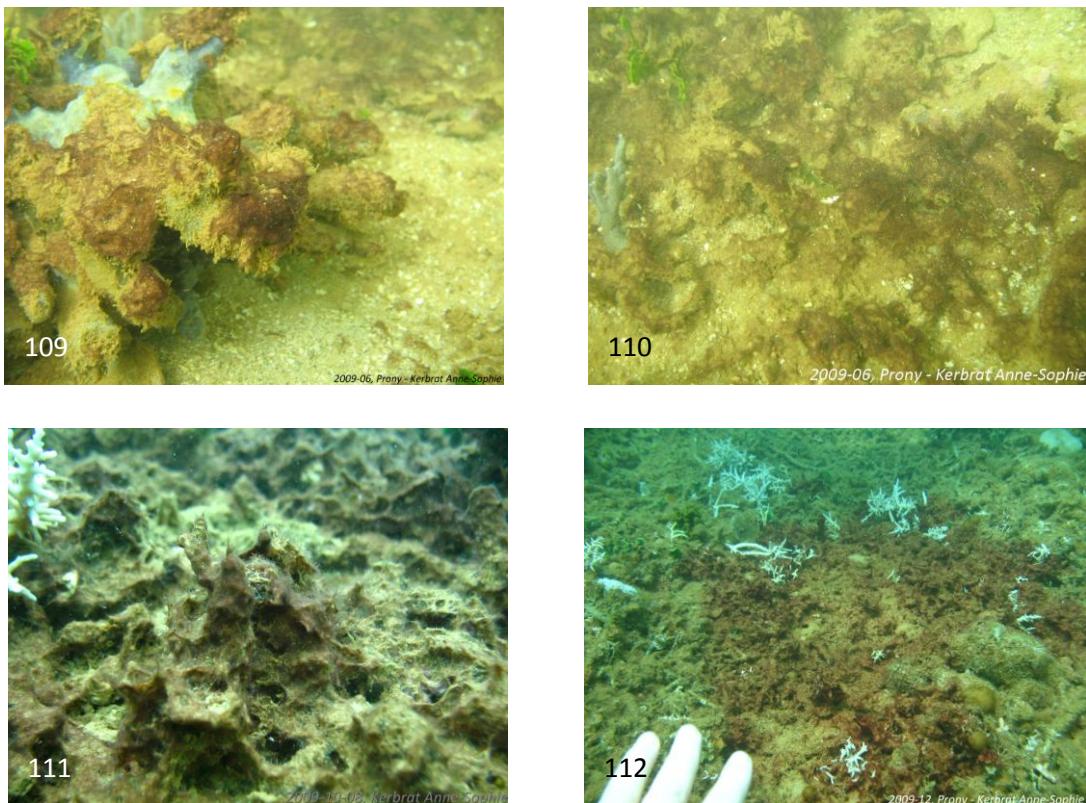
Cyanobactéries

La présence de cyanobactéries majoritairement filamentueuses est observée régulièrement en plongée sur les sites d'observations (photos 105, 106, 107 et 108). Constituant des tapis restreints, de quelques cm² à maximum 1m², elles sont naturellement présentes en baie de Prony (Baie Nord, Ilot Casy, Bonne Anse) et à la passe de Port Boisé.



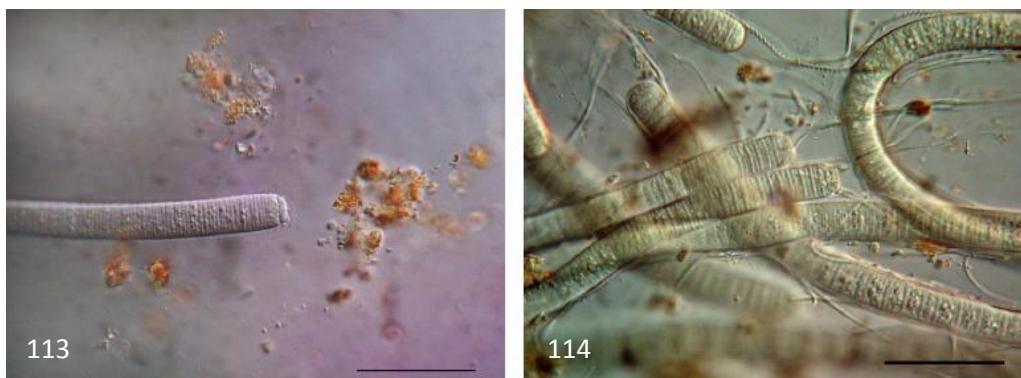
Photos 105, 106, 107, 108: Vues *in situ* de différentes Oscillatoires observées entre 2008 et 2009 à Port Boisé (105), Bonne Anse (106) et l'îlot Gabriel (107 et 108). Naturellement présentes, leurs étendues ne dépassent pas 1 m².

A partir de juin 2009 et jusqu'en février 2010, des tapis composés majoritairement d'*Hydrocoleum lyngbyaceum* (Kützing) et d'*H. glutinosum* (Gomont ex Gomont, 1892) (photos 109 et 110) sont observés dans la zone du port (site 4). La superficie est importante dans les premiers mois (environ 20 m²) jusqu'en décembre 2009, date à partir de laquelle la population diminue progressivement (photo 111) pour ne plus être visible à partir de février 2010 (photo 112). Le tapis recouvre un substrat détritique et rocheux dû à la construction de la zone portuaire sur une pente douce de 3 à 5 m de profondeur.



Photos 109, 110, 111, 112: Vues *in situ* du tapis cyanobactérien dominé par *H. lyngbyaceum* et *H. glutinosum* recouvrant des débris coralliens en juin 2009 (109 et 110), en octobre 2009 (111) et en diminution à partir de décembre 2009 (112).

La population d'*H. lyngbyaceum* récoltée en novembre 2009 est constituée de trichomes de largeur $12,2 \pm 0,96 \mu\text{m}$ ($n = 15$) et de cellules de $3,28 \pm 0,5 \mu\text{m}$ ($n = 4$) (photos 113 et 114).



Photos 113 et 114 : Vues microscopiques de trichomes d'*H. lyngbyaceum* (113) et d'*H. glutinosum* (114) récoltées en novembre 2009 en site 4 à Prony (barre d'échelle = 50 µm).

Des tapis cyanobactériens de surface importante sont observés à partir d'août 2009 sur le site dit de Bonne Anse (site 2) (photos 115 et 116). La superficie du tapis est difficile à caractériser tant celui-ci est discontinu, mais il est présent sur une zone d'environ 500 m

longeant la côte. Ce tapis recouvrant des débris branchus coralliens est dominé par l'espèce filamentueuse *H. cantharidosmum* (photos 117).



Photos 115, 116, 117 : Vues *in situ* du tapis cyanobactérien dominé majoritairement par *H. cantharidosmum* recouvrant des débris coralliens en décembre 2009 (115) et avril 2004 (116) et vue microscopique (117), barre d'échelle = 50 µm).

Pour ces deux sites (port, n°4 et Bonne anse, n°2), aucune saisonnalité des tapis dominés par *Hydrocoleum* spp. n'a été mise en évidence jusqu'à présent (suivi de leur présence sur une année). Les trois espèces ont été rencontrées à Lifou et ont démontré des toxicités similaires à celles démontrées par les analyses effectuées sur les mattes récoltées au port (n°4). Leur suivi pourrait permettre de caractériser la dynamique de ces populations ou du moins, suivre les toxicités présentes sur les sites.

D'autre part, un suivi écosystémique est mené par Vale NC sur 12 stations localisées en baie de Prony et dans le canal de la Havannah selon une méthode d'observation de couloir (annexe 6). Le suivi des stations comprend l'identification et la quantification des communautés biotiques (les coraux scléractiniaires, les macrophytes et les invertébrés) et le substratum. Depuis octobre 2008, la présence et la quantification des cyanobactéries ont été intégrées à ce suivi (figure 68). De l'ensemble des observations relevées, on peut noter les abondances en cyanobactérie supérieures de 5 (> 15% du couloir considéré) au niveau du port en juin 2009. L'identification de ces cyanobactéries n'est pas disponible mais ces observations corréleraient avec nos résultats : absence en 2008 et présence en grande quantité en 2009. En outre, il est intéressant de noter la présence de tapis cyanobactériens à l'îlot Casy (au niveau de la zone des mouillages) et à Port Boisé (Pointe Puka), face à notre zone de pêche en abondance 2 caractérisée de « faible » (0,5% à 5% du couloir). D'autres stations notamment dans la réserve Merlet (station 10, annexe 6), en dehors de pressions caractérisées, montrent également des proliférations de tapis cyanobactériens (données non présentées). L'ensemble des observations montre la présence de cyanobactéries plutôt centrée dans la zone des 10 m.

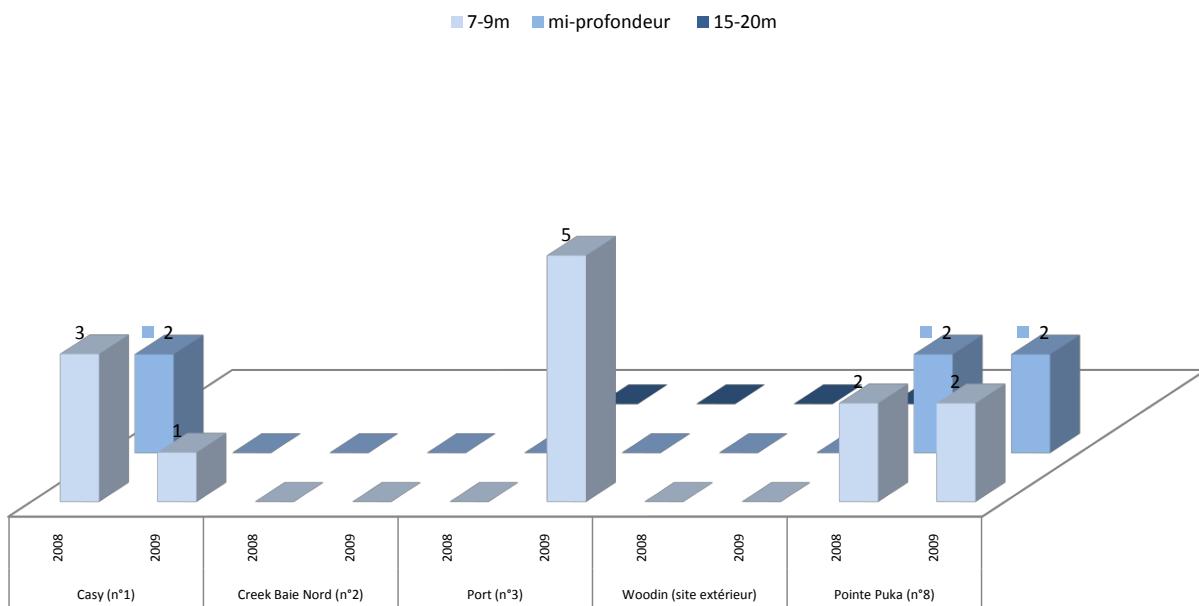


Figure 68 : Relevés des abondances des cyanobactéries sur 5 sites en octobre 2008 et juin 2009 (données Vale NC, voir annexe pour les sites et le détail de la méthodologie).

III.2.b.2 Analyses toxicologiques

Les analyses toxicologiques sont menées sur les mattes de cyanobactéries collectées au niveau du port (site 4, *H. lyngbyaceum* et *H. glutinosum*) récoltées en octobre 2009 (P30). Le caractère dispersé des tapis cyanobactériens observés à Bonne Anse en site 2 (*H. cantharidiosmum*) n'a pas permis, avec les moyens disponibles au moment des efflorescences, de récolter suffisamment de matière : l'aspirateur sous-marin n'avait pas été encore mis en place.

Rendement d'extraction

Les rendements d'extraction des mattes collectées en site 4 (P30) sont pour la fraction hydrosoluble de 41% par rapport à la masse lyophilisée et pour la fraction liposoluble de 0,18%.

Test Souris, extrait hydrosoluble

Le test souris a permis de démontrer que les mattes dominées par *H. lyngbyaceum* et *H. glutinosum* (port, n°4) possèdent des composés hydrosolubles provoquant une toxicité de type **paralysante** chez les souris injectées en i.p. La toxicité est classée en Tox++ et la DL₅₀ est estimée à 1,5 à 2,0 mg d'extrait par g de souris. Les symptômes sont une paralysie générale du corps, une diminution de la réactivité et une réaction de type allergique au niveau des yeux ; la mort survient par détresse respiratoire.

Tests N2A et Test RBA, extrait liposoluble

Les trois fractions (F1, F2 et F3) issues de la purification sur Sep-pak® de l'extrait liposoluble sont analysées par test N2A. Les courbes de cytotoxicité sont présentées en figure 69.

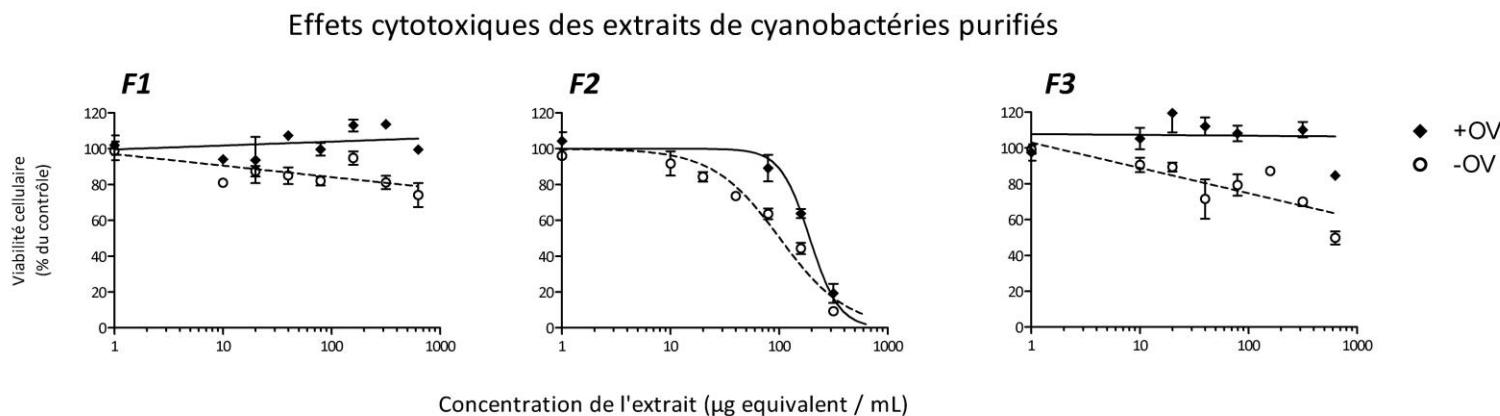


Figure 69 : Courbes de cytotoxicité des fractions F1, F2 et F3 des extraits liposolubles de cyanobactéries récoltées en octobre 2009 en baie de Prony (site 4, P30).

Les fractions F1 et F3 n'induisent pas de cytotoxicité dose-dépendante -OV et +OV. Par contre, la fraction F2 (90 : 10) est cytotoxique en conditions +OV et -OV, les IC_{50} calculées sont de 192 et 102 µg eqv d'extrait / mL respectivement. Ces effets cytotoxiques ($n = 2$) démontrent une toxicité non spécifique des CSSP (toxicité en conditions +OV et -OV).

Cette fraction F2 analysée à l'aide du test RBA induit une toxicité équivalente à 1,06 µg éqv de P-CTX-3C / g d'extrait.

L'ensemble de ces analyses démontre la présence dans ces mattes collectées dans la zone du port (site 4) en octobre 2009 et dominées par *H. lyngbyaceum* et *H. glutinosum* :

- De composés hydrosolubles toxiques d'activité paralysante sur souris, et
- D'un complexe de composés liposolubles de polarité proche des CTXs avec des activités propres :
 - (i) d'action cytotoxique non spécifique du CSSP (test N2A),
 - (iii) d'une action toxique spécifique du site 5 des CSSP (test RBA).

Identification des toxines

La recherche de cyanotoxines ou phycotoxines par la méthode multi-toxinique du laboratoire des phycotoxines de l'IFREMER a été utilisée pour l'analyse toxinique de ce tapis de cyanobactéries. La méthode par LC-MS/MS permet de détecter un large spectre de toxines détaillé dans la partie précédente (cf. ch.2.II.3.d). L'analyse de l'échantillon lyophilisé de

cyanobactéries dominé par *Hydrocoleum lyngbyaceum* n'a montré la présence d'aucun des composés détectables par la méthode multi-toxinique.

III.2.c Poissons

III.2.c.1 Récolte

Deux campagnes de prélèvements ont permis de collecter 53 individus en 2008 et 46 en 2009 (tableau 52) avec un minimum de 15 poissons par zones de pêche. L'ensemble des données de prélèvements est reporté en annexe 7 : la zone de pêche, la référence, la famille, l'espèce (nom scientifique et vernaculaire), le régime alimentaire, les paramètres biométriques et les planches photos.

Tableau 52 : Nombre de poissons prélevés par zone en 2008 et 2009.

Zones		Coordonnées GPS	Nombre d'individus	
			2008	2009
Zone 1	Port de Prony	S 22°20,682' / E166°52,956' S 22°21,391' / E166°53,579'	19	15
Zone 2	Bonne Anse	S22°23,869' / E166°53,012' S20°23,700' / E166°52,928'	15	15
Zone 3	Port Boisé	S22°21,624' / E166°58,095' S22°21,437' / E166°58,072'	16	16
Zone 4	Îlot Gabriel	S 22°19,993' E166°52,124'	3	-
			53	46

Espèces récoltées

Tenant compte des critères définissant les espèces sentinelles spécifiques à la méthodologie appliquée dans l'étude de Prony, un nombre restreint de 12 espèces est répertorié sur les 99 spécimens pêchés en 2008 et 2009. La figure 70 représente le nombre d'individus par espèces pêchées et par zone et la figure 71 répertorie les espèces les plus fréquentes.

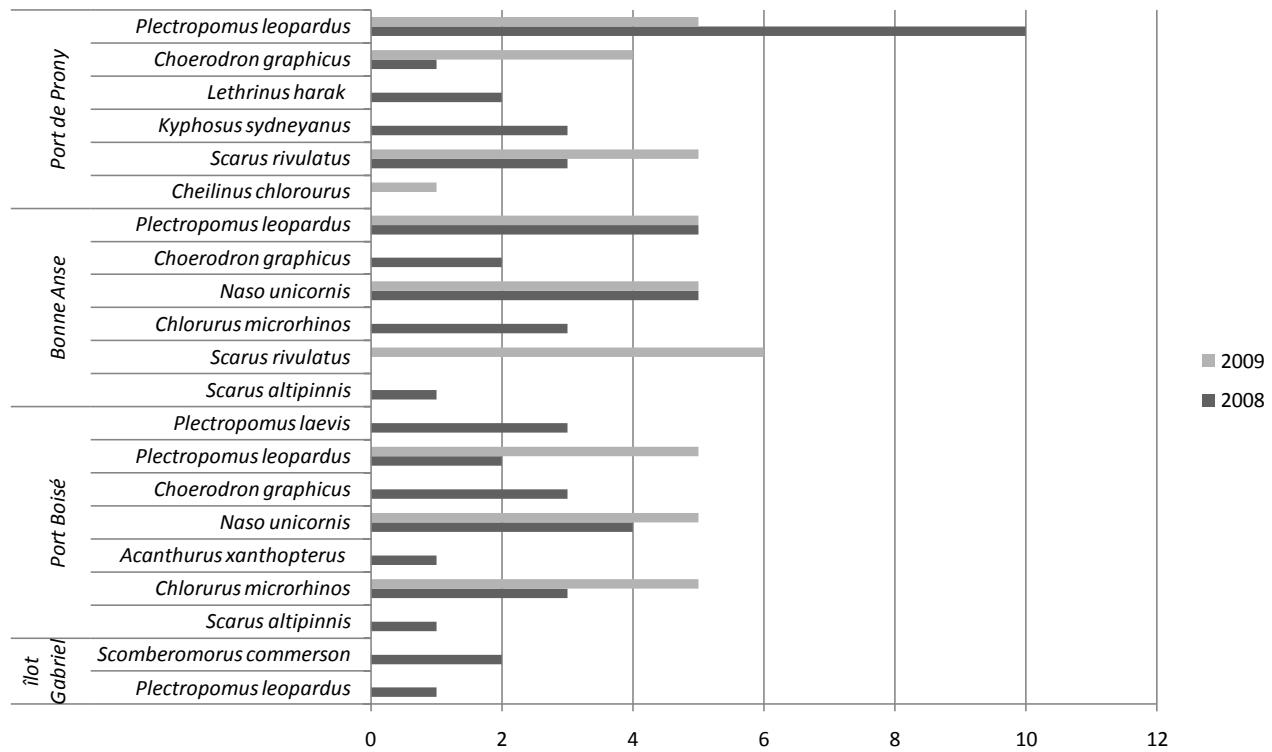


Figure 70 : Nombre d'individus par espèces collectées en 2008 et 2009 réparties par zone.



Figure 71 : Espèces récoltées sur les zones du port de Prony, Bonne Anse et Port Boisé en 2008 et 2009.

Voici un bref descriptif des espèces rencontrées en commençant par les niveaux trophiques inférieurs. Le niveau trophique (ou indice) est défini par la base de données « Fishbase » gérée par neuf instituts de recherche dont le Muséum National d'Histoire Naturelle :

- *Scarus altipinis* et *Scarus rivulatus*

Scarus altipinis (Steindachner, 1879) et *Scarus rivulatus* (Valenciennes, 1840) déjà rencontré à Lifou, sont des poissons perroquets corallivores vivant en banc. Les perroquets vivent du littoral à la pente externe mais selon les espèces, possèdent des comportements ubiquistes ou plutôt inféodés à un faciès. *S. rivulatus* serait plutôt de comportement ubiquiste du lagon avec une préférence pour la zone 5 à 15 m. Quant à *S. altipinis*, il fréquente plutôt les récifs coralliens sous influence océanique (typique de la zone de pêche 2). Ces poissons sont très appréciés des consommateurs. Généralement reconnus pour être sans risque, nous avons pu nous rendre compte à travers les intoxications sévères à Lifou que le genre *Scarus* n'est pas épargné par l'accumulation de toxines, même si son potentiel de risque peut être considéré plus faible. Leur niveau trophique est de **2,0**.

- *Chlorurus microrhinos* (Bleeker, 1854)

Chlorurus microrhinos est un *Scaridae* reconnaissable à sa bosse frontale, il est parfois nommé perroquet bleu. Ubiquiste, il vit dans le lagon et affectionne les pentes externes. Herbivore de niveau trophique **2,0**, Fishbase l'indique comme poissons à risque ciguatérique.

Ces trois espèces de poissons-perroquets sont ici associées au régime herbivore et constituent un indicateur d'un phénomène ciguatérique en émergence.

- *Kyphosus sydneyanus*

Kyphosus sydneyanus de la famille des *Kyphosidae* est connu en Nouvelle-Calédonie sous le nom **wi-wa**. Ce poisson à petite tête vit en banc dans des eaux peu profondes au niveau des zones récifales agitées. C'est un omnivore même si les algues constituent la majorité de son alimentation. Fishbase le signale comme non ciguatérique et de niveau trophique **2,0**.

- *Naso unicornis* (Forsskål, 1775)

Ce poisson-chirurgien de la famille des *Acanthuridae*, nommé **Dawa** en Nouvelle-Calédonie, se distingue par sa proéminente corne, redoutable arme défensive. Il vit habituellement en groupe et est ubiquiste de la zone corallienne de 3 à 30 m, il est rencontré plus fréquemment dans les zones de déferlement des vagues. Herbivore, il consomme majoritairement les phéophycées du genre *Sargassum* et *Turbinaria*. Ce poisson dont la chair est savoureuse (particulièrement les individus du sud de la Grande Terre) est localement réputé indemne de ciguatéra. Le site Fishbase le déclare pourtant à risque ; son indice trophique est de **2,17**.

- *Cheilinus chlorourus* (Bloch, 1791)

Cheilinus chlorourus de la famille des *Cheilininae* est nommé **vieille tachetée** ou labre maori. Cette espèce vit à proximité des algueraines et des herbiers, dans des zones mixtes des

lagons (sables, éboulis, coraux) et des récifs côtiers de 2 à 30 m de profondeur. Il se nourrit majoritairement d'invertébrés benthiques comme les mollusques et les crustacés. Son niveau trophique est de **3,42**.

- *Choerodon graphicus* (Devis, 1855)

Choerodon graphicus est un labre de la famille des *Lethrinidae* connu localement sous le nom de **perroquet wallis**. Il vit plutôt en solitaire au niveau des étendues de sable ou d'éboulis des lagons et des pentes externes jusqu'à la zone des 20 m. Relativement commun et facile à approcher, il se nourrit de coquillages, de crustacés ou d'oursins, il est classé sous le régime de molluscivore. D'après Fishbase, son niveau trophique est de **3,54** et ce labre est réputé sans risque ciguatérique.

- *Lethrinus harak* (Forsskål, 1775)

Lethrinus harak est connu sous le nom de **bossu d'herbe** en Nouvelle-Calédonie. Ce poisson de la famille des *Lethrinidae* affectionne les fonds meubles des herbiers et des algueraies. Il se nourrit d'une diversité d'organismes comprenant les vers, les mollusques, les oursins de sable, les crustacés et les poissons, il est donc qualifié d'omnivore. Apprécié des consommateurs, des cas d'intoxications ciguatériques parfois sévères ont été signalés sur le territoire. Son niveau trophique est **3,56**.

- *Plectropomus leopardus* (Lacepède, 1802)

Plectropomus leopardus de la famille des *Serranidae* est une espèce bien connue en Nouvelle-Calédonie sous le nom de **Saumonée**. Espèce ubiquiste, on la retrouve depuis le littoral jusqu'au récif barrière à 50 m de profondeur, tant au niveau des récifs coralliens que des pinacles ou des algueraies. Elle est très présente dans la baie de Prony jusqu'à Port Boisé. Carnivore, son alimentation est variée se nourrissant de crustacés, de mollusques et de poissons. Son niveau trophique est de **4,49**. Déjà collectée à Lifou, elle est reconnue en Nouvelle-Calédonie pour être indemne de toxicité. Elle se distingue de la saumonée dite gros points (*P. laevis*) dont le risque ciguatérique est reconnue localement indiscutable !

- *Scomberomorus commerson* (Lacepède, 1800)

Scomberomorus commerson de la famille des *Scombridae* est nommé thazard du lagon en Nouvelle-Calédonie. Grand pélagique, il est plutôt solitaire vivant au niveau des pentes externes, des passes et des grandes étendues lagonaires. Il est connu pour effectuer de grandes migrations mais certaines populations resteraient plutôt sédentaires. Carnivore, il se nourrit d'aiguillettes, d'anchois, de fusiliers, de sardines et de calmars. Son niveau trophique est de **4,5**. Ce poisson est très recherché pour sa chair appréciée mais les gros spécimens sont susceptibles de provoquer des intoxications, comme nous avons déjà pu le préciser précédemment (Hahn and Capra, 1992).

Le nombre d'espèce par zone et par année associant la valeur du niveau trophique est reporté en tableau 53.

Distribution de taille et de poids.

Afin de se soustraire des variabilités de toxicité par individu liées à sa taille et son poids, les poissons ont été péchés de telle sorte que les distributions de taille et de poids varient peu. Pour certaines espèces, les distributions en poids peuvent être relativement importantes (ex. les individus *C. graphicus* collectés en zone du port en 2009 : $m = 835 \text{ g} \pm 732$) ; mais en tout état de cause, le nombre d'individus reste trop faible pour pouvoir conclure quant à la variabilité de réponse liée à ces deux paramètres biométriques.

Afin d'étudier la variabilité de la toxicité des individus selon leur taille ou le poids, un échantillonnage beaucoup plus conséquent permettant d'avoir une distribution de taille et de poids à plus large spectre serait nécessaire. Cette étude constituerait un suivi à part entière et, de manière à évaluer les toxicités des individus par espèce, l'association de l'information « âge » du spécimen (par l'analyse des otolithes) permettrait d'avoir une réelle idée du phénomène de bioaccumulation des toxines.

Tableau 53 : Espèces de poissons collectées au Port de Prony, à Bonne Anse, à Port Boisé et à l'îlot Gabriel en 2008 et 2009 : Régime alimentaire et indice trophique, nombre d'individus, moyenne de taille \pm ET (en cm) et de poids \pm ET (en g) par espèce.

Nom de la zone	Espèce	Régime alimentaire	Indice trophique	2008			2009		
				Nombre	Masse Moy \pm ET (g)	Longueur Moy \pm ET (cm)	Nombre	Masse Moy \pm ET (g)	Longueur Moy \pm ET (cm)
Port de Prony	<i>Scarus rivulatus</i>	Herbivore	2,00	3	470 \pm 147	27 \pm 3	5	564 \pm 126	27 \pm 2
	<i>Kyphosus sydneyanus</i>	Omnivore	2,00	3	753 \pm 129	31 \pm 2			
	<i>Cheilinus chlorourus</i>	Brouteur IB	3,42				1	-	21
	<i>Choerodon graphicus</i>	Molluscivore	3,54	1	700	30	4	835 \pm 732	29 \pm 9
	<i>Lethrinus harak</i>	Omnivore	3,56	2	280 \pm 28	24 \pm 1			
	<i>Plectropomus leopardus</i>	Carnivore	4,49	10	729 \pm 396	35 \pm 7	5	990 \pm 525	37 \pm 7
Bonne Anse	<i>Scarus rivulatus</i>	Herbivore	2,00				6	613 \pm 103	28 \pm 1
	<i>Chlorurus microrhinos</i>	Herbivore	2,00	3	1253 \pm 383	38 \pm 5			
	<i>Naso unicornis</i>	Herbivore	2,17	5	1376 \pm 413	40 \pm 4	5	2200 \pm 596	42 \pm 2
	<i>Choerodon graphicus</i>	Molluscivore	3,54	2	750 \pm 212	32 \pm 3			
	<i>Plectropomus leopardus</i>	Carnivore	4,49	5	1242 \pm 275	43 \pm 3	5	1040 \pm 167	38 \pm 2
	<i>Scarus altipinnis</i>	Herbivore	2,00	1	1300	39			
Port Boisé	<i>Acanthurus xanthopterus</i>	Herbivore	2,87	1	1300	39			
	<i>Chlorurus microrhinos</i>	Herbivore	2,0	3	1100 \pm 100	36 \pm 2	5	1380 \pm 342	37 \pm 3
	<i>Naso unicornis</i>	Herbivore	2,17	4	2075 \pm 250	46 \pm 2	5	2700 \pm 903	45 \pm 4
	<i>Choerodon graphicus</i>	Molluscivore	3,54	3	1033 \pm 404	35 \pm 5			
	<i>Plectropomus laevis</i>	Carnivore	4,14	3	2000 \pm 819	50 \pm 6			
	<i>Plectropomus leopardus</i>	Carnivore	4,49	2	1750 \pm 778	48 \pm 8	5	982 \pm 333	38 \pm 4
	<i>Scarus altipinnis</i>	Herbivore	2,00	1	500	31			
îlot Gabriel	<i>Plectropomus leopardus</i>	Carnivore	4,49	1	500	32			
	<i>Scomberomorus commerson</i>	Carnivore	4,50	2	3490 \pm 721	78 \pm 4			

III.2.c.2 Analyses toxicologiques, Test N2A

Au total 99 poissons ont été analysés par le test N2A : 53 en 2008 et 46 en 2009. L'annexe 7 donne l'ensemble des classes de toxicité obtenues par poisson.

Toxicité globale

Le nombre de spécimens en pourcentage par zone et par classe de toxicité, ATox, Tox+ et Tox++ est synthétisé dans le tableau 54. D'après le test N2A, en 2008, 79% des poissons pêchés sont atoxiques et 21% toxiques (17% moyennement toxiques et 4% fortement toxiques). En 2009, 93% sont atoxiques et 6% toxiques (4% faiblement et 2% fortement toxiques). On ne peut conclure quant à l'évolution de la toxicité entre 2 années de suivi et entre les zones et particulièrement en tenant compte des incertitudes liées à la réponse du test. Cependant, les valeurs de toxicité restent faibles et comparables à un écosystème reconnu pour être indemne de ciguatera comme à Ouvéa. Seul 4% et 2% des individus collectés en 2008 et 2009 présentent un niveau de toxicité pour lequel l'Homme serait sensible (Tox++).

Tableau 54 : Nombre d'individus toxiques (Tox+ et Tox++) ; en %) pêchés en 2008 et en 2009 par zone, en baie de Prony et à Port Boisé.

Année	Nom de la zone		Atox %	Tox+ %	Tox++ %
2008	Port de Prony	n = 19	68	26	5
	Bonne Anse	n = 15	80	13	7
	Port Boisé	n = 16	88	13	0
	îlot Gabriel	n = 3	100	0	0
		n = 53	79	17	4
2009	Port de Prony	n = 16	80	13	7
	Bonne Anse	n = 15	100	0	0
	Port Boisé	n = 15	100	0	0
		n = 46	93	4	2
		n = 99	86	11	3

Toxicité par zone et par espèce

Le nombre de spécimens par classe de toxicité par espèce est présenté en tableau 55. Pour les espèces dont le nombre est supérieur à 5, les données indiquent que les espèces *C. graphicus* et *P. leopardus* sont les plus touchées (50% et 15% respectivement). Quant aux espèces *S. rivulatus*, *C. microrhinos* et *Naso unicornis*, aucun individu péché n'a montré de toxicité (100% Atox) sur les deux années.

Tableau 55 : Nombre d'individus par classe de toxicité (Atox, Tox+ et Tox++) et par espèce pêchés en 2008 et en 2009 par zone, en Baie de Prony et à Port Boisé.

Nom de la zone	Espèce	2008			2009		
		Atox	Tox+	Tox++	Atox	Tox+	Tox++
Port de Prony	<i>Scarus rivulatus</i>	3			5		
	<i>Lethrinus harak</i>	1	1				
	<i>Cheilinus chlorourus</i>				1		
	<i>Choerodon graphicus</i>		1		2	1	1
	<i>Kyphosus sydneyanus</i>	1	2				
	<i>Plectropomus leopardus</i>	8	1	1	4	1	
<i>Total Port de Prony</i>		13	5	1	12	2	1
Bonne Anse	<i>Scarus altipinnis</i>	1					
	<i>Chlorurus microrhinos</i>	3					
	<i>Naso unicornis</i>	5			5		
	<i>Scarus rivulatus</i>				6		
	<i>Choerodon graphicus</i>	1		1			
	<i>Plectropomus leopardus</i>		2	2		5	
<i>Total Bonne Anse</i>		12	2	1	16		
Port Boisé	<i>Scarus altipinnis</i>	1					
	<i>Chlorurus microrhinos</i>	3			5		
	<i>Naso unicornis</i>	4			5		
	<i>Acanthurus xanthopterus</i>	1					
	<i>Choerodon graphicus</i>	2	1				
	<i>Plectropomus leopardus</i>	2			5		
<i>Plectropomus laevis</i>		1	1				
					14	2	15
<i>Total Port Boisé</i>							
îlot Gabriel	<i>Plectropomus leopardus</i>	1					
	<i>Scomberomorus commerson</i>	2					
<i>Total îlot Gabriel</i>		3					

Toxicité par régime alimentaire

La figure 72 représente le nombre d'individus Tox+ et Tox++ selon leur niveau trophique et leur zone de récolte. Tous les régimes trophiques présentent des spécimens toxiques excepté les herbivores (*Scarus*, *Chlororous* ou *Naso unicornis*). Ces poissons sont situés au plus bas de la chaîne trophique (indice 2,00 et 2,17) et leur atoxicité pourrait indiquer qu'aucun phénomène ciguatérique n'est en émergence dans les zones de pêche considérées.

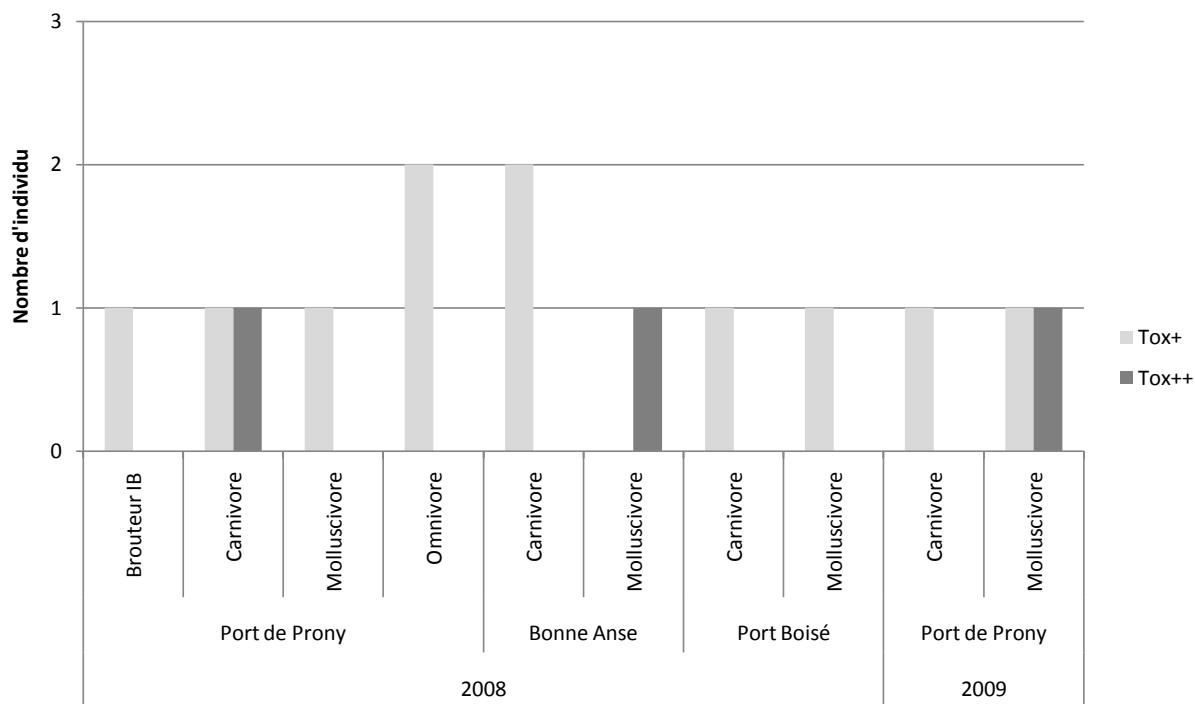


Figure 72 : Nombre d'individus toxiques (Tox+ et Tox++) pêchés en 2008 et en 2009 selon leur zone (Port, Bonne Anse et Port Boisé) et leur régime alimentaire.

Afin de faciliter l'analyse des toxicités, les espèces sont regroupées en trois classes de niveaux trophiques : A (2,00) regroupant les perroquets, B (]2; 3]) regroupant les autres herbivores, les molluscivores et les omnivores et C (]3 ; 5]) regroupant les carnivores. Les données pour 2008 et 2009 sont présentées en figure 73.

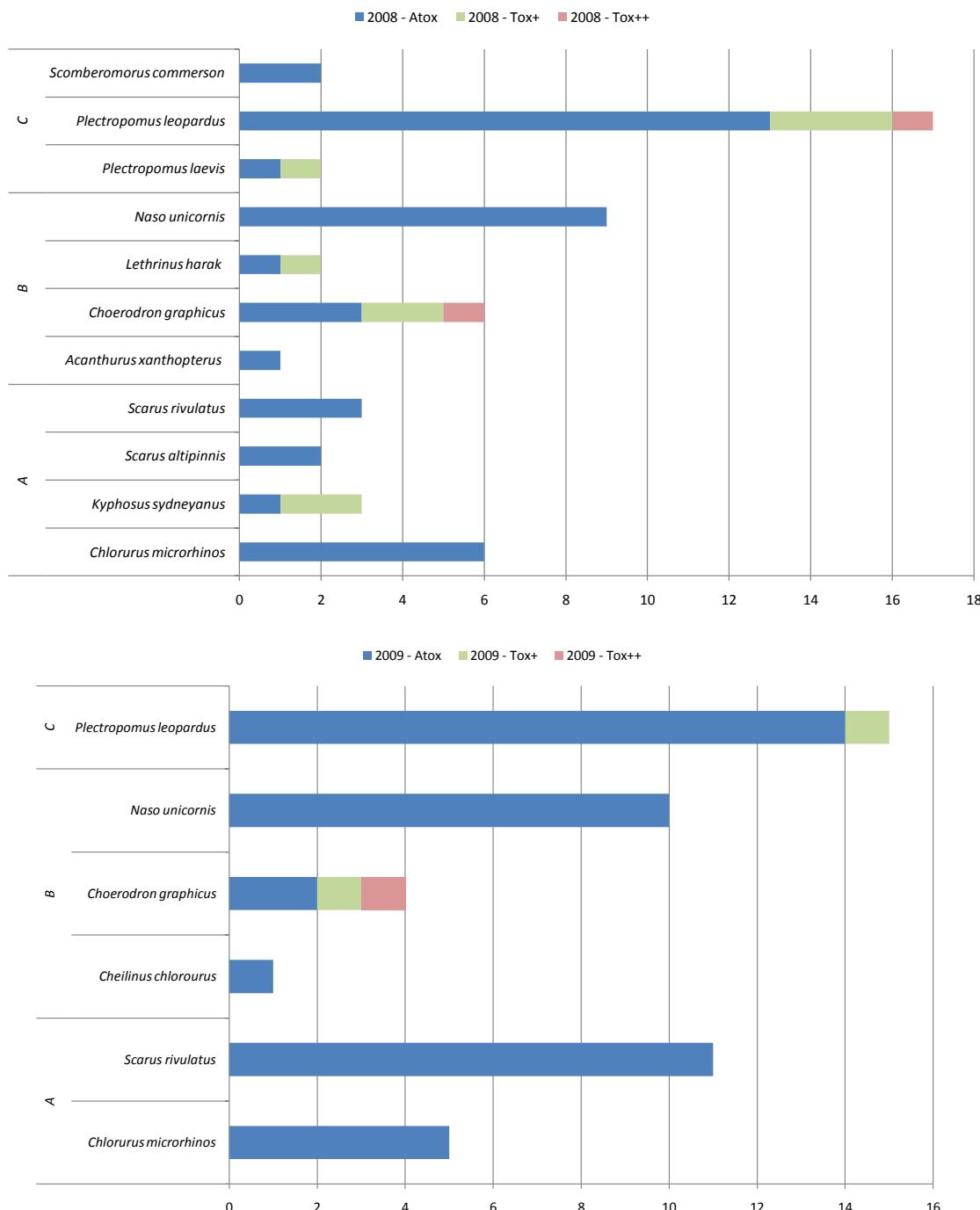


Figure 73 : Nombre d'individus par classe de toxicité (Atox, Tox+ et Tox++) pêchés en 2008 et 2009 selon le régime alimentaire groupé par classe : A (2,00) regroupant les perroquets, B (12 ; 3] regroupant les autres herbivores, les molluscivores et les omnivores et C (13 ; 5] regroupant les carnivores.

Toxicité par zone de prélèvement

Les données de toxicité par espèce et selon la zone de pêche sont représentées en figure 74. En 2008, des individus toxiques ont été pêchés dans toutes les zones de pêche (2 poissons, classés Tox++ uniquement en zone du Port de Prony et à Bonne Anse). En 2009, seuls trois

individus toxiques (2 Tox+ et 1 Tox++) ont été pêchés en zone du Port de Prony. Le Port de Prony présente les individus les plus toxiques par rapport aux deux autres zones mais il possible que cette variation soit liée au prélèvement de poissons *K. sydneyanus* et *L. harak* et *C. graphicus* au port de Prony. On peut conclure que les taux de toxicité des populations pêchées dans les trois zones en 2008 et 2009 restent faibles.

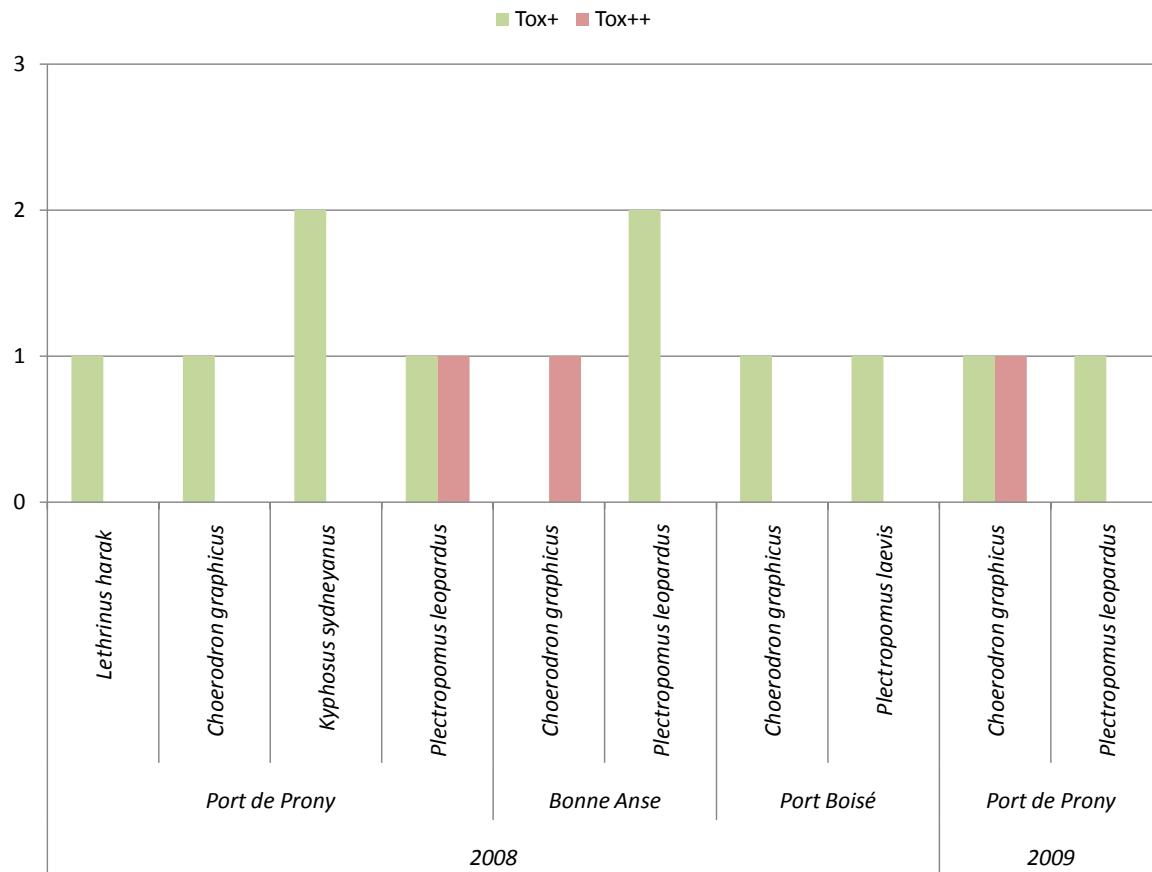


Figure 74 : Nombre d'individus pêchés en 2008 et 2009 par classe de toxicité (Tox+ et Tox++) selon l'espèce et la zone de prélèvement.

IV. Discussion

IV.1 Avant propos : la méthode de suivi

Les deux études présentées suivent une méthodologie commune à des études écotoxicologiques antérieures prenant en compte à la fois les organismes toxinogènes et la chaîne pisciaire. En baie de Prony, nous avons amélioré la méthodologie d'approche en l'adaptant à l'environnement dans une optique de suivi sanitaire pour un développement d'outil spécifique et utilisable en routine.

Les résultats des deux études présentent certaines limites et les informations doivent être prises avec précaution en raison des différents **facteurs de variabilités possibles** :

Variabilités au niveau des micro-organismes

La variabilité spatiale et temporelle de la dynamique des dinoflagellés et des cyanobactéries doit être prise en compte lors de l'échantillonnage. La fréquence et la zonation des points d'échantillonnage tendent à être le plus exhaustif possible. Mais il est évident que le suivi spatial tant à Ouvéa qu'à Prony ne permet pas l'obtention d'une carte complète des populations benthiques à un moment donné.

Ainsi, nous avons ciblé des sites d'observations en fonction de caractéristiques définies qui sont présentées en méthodologie. Quant à la variabilité temporelle, au vu des dynamiques de populations, il est possible pour Prony, et fort probable à Ouvéa, que nous soyons passés à côté d'efflorescences pourtant présentes. En tenant compte de la difficulté de suivre l'ensemble des zones considérées à une fréquence beaucoup plus grande, nous avons établi à Prony une fréquence mensuelle qui semble être un bon compromis.

Variabilités au niveau de la chaîne pisciaire

- *Délimitation de la zone de pêche*

Pour suivre la toxicité des populations pisciaires à Ouvéa et à Prony, nous avons défini des zones selon différents critères : zone de pêche vivrière, zone potentiellement impactée, zone sans perturbations... Les limites de ces zones peuvent être considérées étendues ou restreintes suivant que l'on considère (i) la zone de pêche vis-à-vis du pêcheur (ex : plusieurs hectares dans le lagon d'Ouvéa), (ii) un impact localisé (rampe de mise à l'eau) ou encore (iii) la zone de vie et de déplacement d'un poisson. La délimitation des zones doit donc tenir compte de l'ensemble de ces critères.

En outre, l'association des points de prélèvements d'algues avec ces zones peut être sujette à discussion : le poisson pêché dans cette zone se nourrit-il effectivement à cet endroit ?

- *Période et fréquence de récolte*

Les deux études présentées évaluent la toxicité des poissons annuellement, en septembre à Ouvéa et en avril en baie de Prony. Les potentielles variabilités saisonnières des toxicités ne sont donc pas prises en compte. De même, selon la période de l'année, les populations de poissons présentes dans les zones peuvent varier notamment en fonction des migrations durant l'année.

- *Choix des espèces dites sentinelles*

L'échantillonnage effectué à Ouvéa a permis de collecter 40 espèces différentes. L'interprétation des résultats pour des espèces dont le nombre de spécimens est trop faible ($n < 5$) n'est guère possible. Il est donc nécessaire de diminuer le nombre d'espèces en faveur du nombre de spécimens collectés par espèce. Cet effort a pu être effectué et amélioré à travers les campagnes menées à Prony en 2008 (11 espèces) puis en 2009 (6 espèces).

Pour les résultats de toxicité de Prony, les régimes alimentaires sont rassemblés en trois classes. Nous avons pu voir que le regroupement des herbivores (A) et des carnivores (C) constituent des groupes homogènes en termes trophiques (gamme d'indice trophique < 1) et

ainsi reste cohérent. Par contre, le régime intermédiaire B regroupe des espèces dont la gamme d'indice trophique est plus large de 2,17 à 3,56 (tableau 53 et figures 73).

Par exemple, le dawa (*Naso unicornis*) (indice trophique 2,17) est une espèce de bas niveau qui présente l'intérêt d'être indicatrice d'une émergence ciguatérique. Elle est présente en zone 2 et 3, mais très peu présente en zone 1 (Port) où elle est remplacée par des espèces de régimes trophiques supérieurs. Afin d'être plus précis dans la comparaison de ce groupe trophique B, une solution pourrait être d'identifier une espèce en zone 1 de niveau trophique plus proche du *Naso unicornis*.

La toxicité des poissons est établie grâce à l'analyse du test N2A, pour une zone donnée et une période de l'année. Les fluctuations dans le temps et dans l'espace sont à prendre en compte dans le cadre d'un suivi puisqu'il est important de le rappeler : le phénomène ciguatérique est un **phénomène transitoire pour une zone considérée**.

Ainsi dans le cadre d'un suivi, pour caractériser l'état d'une zone, les nombreuses composantes du phénomène doivent être identifiées, ou tout au moins les plus importantes d'entre elles. En tenant compte des variabilités énumérées ci-dessus, dans le cas du suivi à Prony, voici les éléments que nous avons décidé de fixer :

- Collecter les micro-organismes à la même fréquence, sur les mêmes zones et les mêmes algues supports,
- Effectuer les campagnes de prélèvement à la même période dans l'année,
- Suivre les mêmes zones de pêches définies,
- Collecter les mêmes espèces définies comme sentinelles,
- Collecter des poissons de même distribution de taille et de poids,
- Utiliser les mêmes techniques de pêche,
- Analyser les poissons de manière identique (prélèvement du filet, extraction, test N2A).

IV.2 Micro-organismes, à la base de la toxicité

Dinoflagellés

Les observations des populations de dinoflagellés faites en 2007 et 2008 à Ouvéa et depuis 2005 à Prony ont mis en évidence la présence naturelle de *Gambierdiscus* sur divers sites. Au vu des faibles teneurs, leur toxicité n'a pas été évaluée avec les outils d'analyse disponibles. Ces populations, en faible densité, ne présentent cependant pas de risque de contamination de la chaîne pisciaire.

Cyanobactéries

A Prony comme à Ouvéa, des tapis cyanobactériens ont été observés recouvrant des surfaces plus ou moins importantes. Dans la Baie de Prony, *H. lyngbyaceum* et *H. glutinosum* sont apparus au niveau du port (site 4) en saison froide et *H. cantharidiosmum* à Bonne Anse

(site 2) durant toute une année. A Ouvéa, différents tapis composés de *P. laysanense* ou *H. lyngbyaceum* sont observés en saison froide à divers endroits.

La présence de ces cyanobactéries filamenteuses est naturelle. Dans certaines zones où le corail est dégradé, des développements massifs peuvent être observés. Au niveau des sites où nous avons pu observer de tels développements, il est possible d'émettre des hypothèses quant à la dégradation du milieu :

Par exemple, à Ouvéa, le chenal de Fayawa qui est la voie d'accès à l'îlot Fayawa est une zone de corail fragilisé (site C02). Ce chenal peut donc être dégradé par le passage de personnes à pied ou à bateaux, mais aussi par le fort **hydrodynamisme** ou les arrivées d'eau douce. Ces facteurs plus ou moins importants favoriseraient l'implantation de cyanobactéries.

De même, les **ancrages** à répétition peuvent constituer des pressions suffisantes pour détruire le corail et voir se développer des tapis cyanobactériens. Cette pression pourrait être présente à Ouvéa au chenal de Wenwook où *H. lyngbyaceum* (C09) a été observée en grande quantité. Cette zone est un chenal où l'hydrodynamisme est important et répertorié par les plaisanciers pour pouvoir s'y mettre à l'abri. Les pêcheurs du nord mouillent également à cet endroit. En baie de Prony, à Bonne Anse (site 2), nous avons pu observer des développements de cyanobactéries identifiés comme *H. cantharidiosmum*. Cette zone subirait probablement le même type de pression extérieure.

Enfin, la zone du Port à Prony (site 4) a vu se développer de larges tapis cyanobactériens sur des surfaces fragilisées par l'implantation des infrastructures portuaires. A ce jour, ces tapis ne sont plus visibles (photo 118) et le substrat détritique est recouvert de Phéophycées du genre *Dictyota* (photo 119). Il est probable que les cyanobactéries constituent une population pionnière de transition avant la recolonisation du substrat par les macrophytes qui tendrait vers un retour à l'équilibre, ou pourquoi pas vers un phénomène écotoxicologique de type ciguatéra avec un développement de dinoflagellés.



Photos 118 et 119 : Vues *in situ* de la zone du port en mai 2010, site 4 où a été observé de juin 2009 à février 2010 les tapis composés d'*H. lyngbyaceum* : les débris coralliens se recouvrent de macrophytes dont la Phéophycée du genre *Dictyota* (119).

Il est donc important de surveiller ces zones fragilisées qui sont des sites propices au développement des populations de dinoflagellés et de tapis cyanobactériens. Ce suivi permet, en cas de présence de souches toxiques en nombre suffisant, de prévenir la potentielle contamination potentielle de la chaîne pisciaire. Les concentrations en toxines dans les chairs de poisson peuvent atteindre un seuil symptomatique chez les herbivores en quelques mois après une efflorescence ciguatoxinogène (chapitre 1).

IV.3 Toxicité des poissons, vecteurs de toxicité

Toxicité globale

Sur Ouvéa, les analyses révèlent globalement une toxicité des poissons inférieure à 20%. Considérant les échantillonnages effectués, ces résultats ne mettent pas en évidence de variabilité en fonction des espèces de poissons, du régime alimentaire, du poids ou de la taille et de la zone de pêche.

Dans la baie de Prony et jusqu'à Port Boisé, les analyses de toxicité démontrent une toxicité de 21% en 2008 et 7% en 2009. Ces valeurs sont comparables à celles obtenues à Ouvéa. L'ensemble de la zone prospectée peut donc être définie comme étant à **faible risque ciguatérique** même si localement en zone du port le pourcentage de poissons toxiques est de 32 % en 2008 et 20% en 2009. Il est à noter que les poissons dont les valeurs de toxicité sont sensibles pour l'Homme (Tox++) restent faibles avec 4% en 2008 et 2% en 2009 (maximum de 5% de Tox++ pour le port).

L'ensemble des observations faites sur les zones suivies de la Baie de Prony ne met pas en évidence de risque ciguatérique pour les zones observées.

Régime alimentaire et espèces

A Ouvéa, où il n'y a pas de différence significative entre les espèces, un niveau résiduel constant de toxicité peut être défini chez les populations de poisson comme Bagnis le suggérait (1986).

En Baie de Prony jusqu'en Port Boisé, aucun herbivore n'est toxique, ceci pouvant traduire un phénomène toxique de faible ampleur touchant encore quelques individus aux maillons supérieurs.

Dans les zones où aucune efflorescence de dinoflagellés, ni de cyanobactéries n'a été enregistré et sans perturbations anthropiques majeures futures, l'absence de risque pour les deux ans à venir peut être envisagé.

Par contre, dans les zones où la présence de cyanobactéries toxiques (site 4) et potentiellement toxique (site 2) a été observée l'année dernière, il est possible que les poissons inféodés à ces zones présentent dans les deux années à venir un certain niveau de contamination. Il serait donc intéressant d'évaluer la toxicité des poissons pour cette année, 2010 et l'année suivante, 2011.

Nous voyons donc ici l'intérêt de suivre la toxicité des populations pisciaires chaque année. Par ailleurs, un suivi biannuel permettrait de suivre cette évolution en tenant compte du caractère saisonnier, facteur important dans le phénomène ciguatériques.

IV.4 Facteurs ciguatoxinogènes

Ouvéa est considérée indemne de ciguatéra par les populations. Or, à travers cette étude, nous avons montré que certains sites présentent un certain nombre d'individus toxiques mais ce risque reste très faible par rapport aux autres îles des loyautés. Ceci peut être expliqué par la configuration de l'atoll associée aux faibles pressions existantes. Les pressions anthropiques et les pressions naturelles semblent avoir un impact restreint sur un lagon ouvert mais protégé par l'atoll. Enfin, les Pléiades n'offrent que peu de biotopes favorables au développement des micro-organismes.

La baie de Prony présente un écosystème protégé de certaines pressions naturelles comme les cyclones et les tempêtes, mais un écosystème somme toute particulier et à ce jour certaines pressions anthropiques sont manifestes. Même si les dinoflagellés y sont présents, les conditions très changeantes de turbidité ou de salinité sont-elles favorables à leur développement ?

Les changements prévus et que nous avons identifiés comme pressions potentielles sont le port et la mise en place du tuyau en termes de perturbations physiques. Ce dernier ne constitue pas à ce jour de risque quant à son implantation, tant il reste éloigné des zones favorables au développement des micro-organismes. Quant au port, les zones perturbées sont à surveiller même si la phase de mise en place ne semble pas avoir induit jusqu'à présent de risque ciguatérique dans la zone considérée ; en effet le pourcentage de poisson毒ique est similaire à celui observé à Ouvéa et aucune prolifération de dinoflagellés n'est observée dans la zone depuis 2005. Cependant, les cyanobactéries toxiques sont apparues dans la zone en juin 2009 jusqu'à février 2010, un terrain favorable ayant permis leur développement. La dynamique de leur population est fonction de divers facteurs qui ne sont pas caractérisés à ce jour. Leur réapparition potentielle est à surveiller à la fois en termes de biomasse et de toxicité. Mais, nous n'avons pas de certitude quant au transfert de cette toxicité vers les divers maillons de la chaîne trophique pisciaire. L'étude de la toxicité des populations de poissons de la zone permettra de préciser ce risque.

Enfin, en vue des pressions ciblées, nous avions donc à juste titre envisagé les infrastructures du port. Mais, à travers le suivi d'observations de l'ensemble des points dans la baie, il a été possible de mettre en évidence l'apparition de tapis cyanobactériens dans une autre zone de Bonne Anse (site 2), site considéré comme témoin. Comme nous l'avons précisé plus haut, au vu de l'état du récif, on peut s'apercevoir que celui-ci présente des zones de souffrance qui peuvent expliquer l'apparition des cyanobactéries à certains endroits. En l'absence de perturbations formellement établies, il est suggéré que les pressions liées aux activités récréatives (ancres de bateau, pêche, plongée libre) dégradent de manière diffuse mais

tout de même conséquente certaines zones. En tout état de cause, ce type d'activités récréatives est une pression qui peut être maîtrisée, par exemple par la mise en place de corps mort ou l'éducation des plongeurs.

IV.5 Evaluation du risque

L'évaluation du risque ciguatérique est à envisager aux niveaux des populations de microorganismes (dinoflagellés et cyanobactéries) et à des maillons sélectionnés de la chaîne pisciaire. Véritables indicateurs du risque ou de l'état de la toxicité d'une zone, ces deux niveaux de suivi (micro-organismes et poissons-sentinelles) constituent un véritable outil de suivi sanitaire. Ils sont également de bons indicateurs de l'état de santé de ces milieux sensibles et vulnérables.

Proposer des outils aux décideurs ou aux acteurs d'aménagement du littoral est un enjeu majeur pour la communauté scientifique. Nous espérons à travers ces travaux avoir donné des outils dans un premier temps pour **une méthode de suivi éco-toxicologique adaptée** et avoir mis à la disposition des décideurs, un outil d'aide à la décision.

Une chose semble essentielle à noter, c'est que même si nous avons pu apporter certaines réponses en termes de connaissance du phénomène ciguatérique, nous n'avons pas encore, de par sa complexité, toutes les clés pour répondre aux décideurs, mais aujourd'hui, la question se pose !!! Ce qui avant n'était pas le cas. Prendre en compte les impacts de nos activités sur l'environnement est un enjeu pour le préserver et pour limiter les déséquilibres provoquant pour la santé humaine des risques ciguatériques. Le simple fait de poser cette question est une avancée dans la prise en compte de l'environnement et dans le développement économique du pays, particulièrement dans des pays insulaires.

V. Conclusions et perspectives

A travers cette étude, nous avons fait état des faibles niveaux de ciguatoxicité à Ouvéa et à Prony. Au vue des populations de micro-organismes présentes dans chacun des écosystèmes, certaines zones restent à surveiller, notamment la zone du wharf du Wadrilla à Ouvéa et la zone du Port à Prony, afin d'anticiper le risque. De même, les populations de poissons sont à suivre pour évaluer le risque d'accumulation des toxines, notamment à la suite du risque identifié en 2009 par la présence des cyanobactéries à potentiel de risque en site 2 et 4.

Enfin, ces études nous ont permis de développer une méthodologie de suivi environnemental, véritable outil de veille sanitaire, en tenant compte à la fois des micro-organismes et des poissons afin de faire état du risque ciguatérique présent et surtout de prévenir le risque.

Conclusions

Conclusions

Les études présentées dans ce manuscrit ont apporté des éléments de compréhension du phénomène écotoxicologique de la ciguatéra et des outils d'évaluation du risque.

Alors que l'implication des dinoflagellés dans le phénomène de la ciguatéra est établie depuis 1980 (Bagnis *et al.*), celle des cyanobactéries est tout à fait nouvelle et est un enjeu majeur dans la compréhension du phénomène. Il est en effet indispensable de tenir compte des cyanobactéries et de leur potentiel de production en toxines de type ciguatérique et paralysante les rendant particulièrement dangereuses. Au sein de la chaîne alimentaire, ces cyanobactéries sont susceptibles de contaminer des poissons brouteurs (perroquets) ou des poissons molluscivores (becs-de-cane) ainsi que des mollusques bivalves filtreurs (bénitiers) voire certains crustacés ou échinodermes (oursins).

Il est fort probable que de nombreuses intoxications aient été attribuées à la ciguatéra classique impliquant les CTXs. En tout état de cause, étant donné que nous sommes face à un complexe toxinique, les symptômes caractéristiques sont présents avec une augmentation de leur sévérité et l'association de symptômes paralysants dus aux toxines hydrosolubles.

Aussi, pour la première fois, nous avons mis en évidence :

- un complexe toxinique de nature hydro- et liposoluble chez certains genres marins d'*Oscillatoriales*, notamment *Hydrocoleum*, *Phormidium*, *Spirulina* et *Oscillatoria*,
- la présence de cyanotoxines neurotoxiques (AnTX-a et HAnTX-a) dans le milieu marin et plus particulièrement chez les cyanobactéries, leur conférant ainsi un potentiel risque en contact direct et un risque croissant par phénomène de bioaccumulation.
- La présence de PTX et de 42-OH-PTX sont identifiées chez *Trichodesmium erythraeum*. Ces toxines sont parmi les substances naturelles les plus complexes et surtout les plus toxiques connues à ce jour après les MTXs. Les teneurs évaluées dans les mattes de *Trichodesmium* prélevées ne présentent heureusement pas de risque en contact direct, mais méritent également une surveillance du risque potentiel lié à un phénomène nouveau de bioaccumulation dans le réseau trophique, à travers le phénomène de clupéotoxicisme et/ou la ciguatéra.

Ces études menées à Lifou apportent une meilleure connaissance du phénomène environnemental et permet d'améliorer la gestion des risques ciguatériques dans les régions coraliennes. L'écosystème marin est complexe et les composantes des phénomènes associant un organisme source, un vecteur et une intoxication alimentaire, comme nous l'avons décrit dans le premier chapitre, ne s'avèrent pas si cloisonnées. Ainsi, pour définir cette intoxication impliquant les cyanobactéries et les dinoflagellés, mettant en cause les poissons (le plus fréquemment) mais également d'autres organismes marins comme les bénitiers ou d'autres mollusques, la dénomination de CSP pour *Ciguatera Shellfish Poisoning*, ou ***Intoxication Ciguatérique par les produits de la mer*** nous paraît plus approprié; cette intoxication est

décrise par i) un complexe toxinique, ii) deux principaux modes d'actions (toxines paralysantes et CTX-like) et iii) les symptômes associés : rapidité des symptômes de type paralysant (engourdissement de la bouche et de la gorge), apparition de symptômes neurologiques après plusieurs heures (état de faiblesse, courbatures, inversion des sensations, picotements).

L'implication des cyanobactéries dans le phénomène ciguatérique a été prise en compte à travers les **études écotoxicologiques menées à Ouvéa et dans la Baie de Prony**. Pour cette dernière, au sein de laquelle des pressions anthropiques clairement identifiées se mettent en place (infrastructures et activités portuaires), nous avons pu développer une méthodologie d'étude ciguatérique adaptée à l'environnement, fiable et utilisable en routine. L'objectif de cette méthode est de pouvoir suivre de manière exhaustive l'évolution de l'apparition potentielle du risque ciguatérique (étude prospective) à des fins de veille sanitaire. Les populations de micro-organismes (dinoflagellés et cyanobactéries) **et** le suivi en parallèle de la toxicité des poissons sentinelles sont des indicateurs du risque ciguatérique et, de manière plus générale de l'état de l'écosystème.

A travers ces études, nous avons montré que ces deux sites présentent, au moment de l'étude, de faibles risques ciguatériques (populations de micro-organismes restreintes) et que le niveau de toxicité des populations pisciaires est faible : le nombre de poissons ciguatoxiques est globalement inférieur à 20%. Cependant, certaines zones, tant à Ouvéa qu'à Prony, sont à surveiller au vu des populations cyanobactériennes présentes, identifiées comme toxiques et dont les dynamiques restent à être caractérisées. En affectant l'équilibre écosystémique, les facteurs anthropiques et les changements naturels peuvent favoriser leur prolifération tout comme celles des populations de dinoflagellés pouvant donc entraîner des biotopes ciguatériques.

La ciguatéra peut être considérée comme une réponse de l'environnement à une pression. Si la capacité de l'écosystème à tamponner cette pression n'est pas suffisante, à court terme (quelques mois à 2 ans), les populations pisciaires risquent d'être contaminées par les CTXs. Pour une zone affectée, la résilience de l'environnement sera d'autant plus rapide que les conditions naturelles le permettront. Nous avons pu le constater pour la zone de Lifou où le phénomène ciguatérique est entretenu : la zone corallienne en transect 1 reste fragilisée par l'hydrodynamisme, les apports d'eau douce, les marées basses (exposition aux températures élevées), les poissons corallivores voire les efflorescences saisonnières de *Trichodesmium* et enfin les successions des populations d'Oscillatoriæ benthiques toxiques.

Ainsi, ces travaux qui ont permis de mieux comprendre le phénomène de la ciguatéra permettent de poser les outils de base d'une veille sanitaire. En effet, le développement d'un réseau de surveillance du risque ciguatérique est un enjeu important pour les populations et particulièrement celles des pays insulaires pour un développement durable.

Mieux connaître pour mieux gérer !

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abed R.M.M., Golubic S., Garcia-Pichel F., Camoin G.F., Sprachta S., 2003. Characterization of microbialite-forming cyanobacteria in a tropical lagoon: Tikehau atoll, Tuamotu, French Polynesia. *Journal of Phycology*, 39(5) : 862-873.
- Abed R.M.M., Palinska K.A., Camoin G., Golubic S., 2006. Common evolutionary origin of planktonic and benthic nitrogen-fixing oscillatoriacean cyanobacteria from tropical oceans. *FEMS Microbiology Letters*, 260 : 171-177.
- Adachi R. and Fukuyo Y., 1979. The thecal structure of a marine toxic dinoflagellates *Gambierdiscus toxicus* gen. et sp. nov. collected in a ciguatera-endemic area. *Bulletin of the Japanese society of scientific fisheries*, 45 : 67-71.
- AFSSA et AFSET, 2006. Risques sanitaires liés à la présence des cyanobactéries dans l'eau. Rapport sur l'évaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries et de leurs toxines dans les eaux destinées à l'alimentation, à la baignade et autres activités récréatives. 232 p.
- Aligizaki K. and Nikolaidis G., 2006. The presence of the potentially toxic genera *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) in the North Aegean Sea, Greece. *Harmful Algae*, 5 : 717-730.
- Aligizaki K. and Fraga N., 2008. Is *Gambierdiscus* expanding to new areas? *Harmful Algae News*, 36 : 6-7.
- Aligizaki K. and Nikolaidis G., 2008. Morphological identification of two tropical dinoflagellates of the genera *Gambierdiscus* and *Sinophysis* in the Mediterranean Sea. *Journal of biological research-Thessaloniki*, 9 : 75-82.
- Aligizaki K., Katikou P., Nikolaidis G., Panou A., 2008. First episode of shellfish contamination by palytoxin-like compounds from *Ostreopsis* species (Aegean Sea, Greece). *Toxicon*, 51 : 418-427.
- Aligizaki K., Nikolaidis G., Katikou P., Baxevanis A.D., Abatzopoulos T.J., 2009. Potentially toxic epiphytic *Prorocentrum* (Dinophyceae) species in Greek coastal waters. *Harmful Algae*, 8 : 299-311.
- Andréfouët S. et Torres-Pulliza D., 2004. Atlas des récifs coralliens de Nouvelle-Calédonie, *IFRECOR Nouvelle-Calédonie*, IRD, Nouméa, 26 p + 22 planches.
- Angibaud G., Lévêque J.M., Laurent D., Gaultier C., 2000. Manifestations neurologiques consécutives à la consommation d'un coquillage du lagon calédonien. *Revue Neurologique* (Paris), 156 : 65-66.
- AOAC International, 2000. AOAC Official Method 959.08 : paralytic shellfish poison, biological method. In AOAC Official Methods of Analysis, 15th ed., *Natural Toxins*, chapter 49 (49.10.01). AOAC International, 49 : 59-60.
- Aráoz R., Nghiem H.O., Rippka R., Palibroda N., Tandeau de Marsac N., Herdman M., 2005. Neurotoxins in axenic oscillatorian cyanobacteria : coexistence of anatoxin-a and homoanatoxin-a determined by ligand-binding assay and GC/MS. *Microbiology*, 151(4) : 1263-1273.
- Aráoz R., Molgó J., Tandeau de Marsac N., 2009. Neurotoxic cyanobacterial toxins. *Toxicon*, doi:10.1016/j.toxicon.2009.07.036.
- Arthur K., Limpus C., Balazs G., Capper A., Udy J., Shaw G., Keuper-Bennett U., Bennett P., 2008. The exposure of green turtles (*Chelonia mydas*) to tumour promoting compounds produced by the cyanobacterium *Lyngbya majuscula* and their potential role in the aetiology of fibropapillomatosis. *Harmful Algae*, 7 : 114-125.

- Bagnis R., 1967. A propos de quelques cas d'intoxications par les mollusques du genre « bénitier » dans une île de la Société. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, 60 : 580-592.
- Bagnis R., 1969. Naissance et développement d'une flambée de ciguatéra dans un atoll des Tuamotu. *Revue des Corps de Santé des Armées*, 107 : 83-795.
- Bagnis R., 1974. Aspects écologiques, biochimiques et immunologiques de la ciguatéra en Polynésie française. *Thèse en Biologie animale*. Bordeaux. 86p.
- Bagnis R., Denizot M., Drollet J.H., Laigret J., 1974. Biotopes ciguatérigènes en Polynésie française. *Revue Internationale d'Océanographie Médicale*, 35-36 : 213-223.
- Bagnis R. et Vernoux J.P., 1975. Ciguatoxine et poissons de récifs comestibles. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 68 (3) : 320-325.
- Bagnis R., 1977. Modalités évolutives et biogenèse de la ciguatéra en Polynésie française. *Thèse en Sciences*. Université Bordeaux I, Bordeaux.
- Bagnis R., 1979. Clinical observations on 3009 cases of ciguatera (Fish Poisoning) in the South Pacific. *American Journal of tropical medicine and hygiene*, 28 : 1067-1073.
- Bagnis R., Chanteau S., Chungue E., Hurtel J.M., Yasumoto T., Inoue A., 1980. Origins of ciguatera fish poisoning: a new dinoflagellate, *Gambierdiscus toxicus* Adachi and Fukuyo, definitively involved as a causal agent. *Toxicon*, 18 : 199-208.
- Bagnis R., 1981. L'ichtyosarcotoxicose de type ciguatéra : phénomène complexe de biologie marine et humaine. *Océanologie Acta*, 4 : 375-387.
- Bagnis R., Chanteau S., Chungue E., Drollet J.H., Lechat-Vahirua I., Legrand A.M., Pompon A., Prieur C., Roux J., Tetaria C., 1985. Comparison of the cat bioassay, the mouse bioassay and the mosquito bioassay to detect ciguatoxicity in fish. *5th International Coral Reef Congress, Tahiti*, 491-496.
- Bagnis R., 1987. Ciguatera fish poisoning: an objective witness of the coral reef stress. In Human impacts on coral reefs: facts and recommendations, Salvat B. Ed. *Antenne Museum EPHE, French Polynesia*, 18 : 241-253.
- Bagnis R., Spiegel A., N'Guyen L., Plachart R., 1992. Trente ans de surveillance sanitaire et épidémiologique de la ciguatéra à Tahiti. In Symposium sur les Substances Naturelles d'Intérêt Biologique de la Région Pacifique-Asie. ORSTOM ed., Nouméa, p. 335-338.
- Baker A.C., Glynn P.W., Riegl B., 2008. Climate change and coral reef bleaching: An ecological assessment of long-term impacts, recovery trends and future outlook. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 80(4) : 435-471.
- Banner A.H., 1961. L'ichtyotoxicose dans les eaux tropicales du Pacifique. Nouméa, Nouvelle Calédonie: Commission du Pacifique Sud. *Bulletin du Pacifique Sud*, 11 (4) : 8-11, 46.
- Banner A.H. and Shaw S.W., Alender C.B. 1963. Intoxication par le poisson: notes sur la ciguatéra et son mode d'action et quelques suggestions thérapeutiques. Nouméa, Nouvelle-Calédonie: Commission du Pacifique sud. Document Technique 141, *Commission du Pacifique Sud*, 21 p.
- Banner A.H., 1967. Marine toxins from the Pacific, I-Advances in the investigation of fish toxins. In *Animal toxins, New-York, Pergamon*, p. 157-165.
- Baumann F., Bourrat M.B., Pauillac S., 2009. Prevalence, symptoms and chronicity of ciguatera in New Caledonia: Results from an adult population survey conducted in Noumea during 2005. *Toxicon*, doi:10.1016/j.toxicon.2009.10.015.

- Bell P.R.F., Uwins P.J.R., Elmetri I., Phillips J.A., Fu F.X., Yago A.J.E., 2005. Laboratory culture studies of *Trichodesmium* isolated from the Great Barrier Reef Lagoon, Australia. *Hydrobiologia*, 532 : 9-21.
- Berridge M.V. and Tan A.S., 1993. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303 : 474-482.
- Bhat S.R. and Verlecar X.N., 2006. Some enigmatic aspects of the marine cyanobacterial genus, *Trichodesmium*. *Current Science*, 91:18-19.
- Bidard J.N., Vijverberg H.P., Frelin C., Chungue E., Legrand A.M., Bagnis R., Lazdunski M., 1984. Ciguatoxin is a novel type of Na⁺ channel toxin. *Journal Biological Chemistry*, 259 : 8353-8357.
- Bienfang P., Oben B., DeFelice S., Moeller P., Huncik K., Oben P., Toonen R., Daly-Engel T., Bowen B., 2008. Ciguatera : the detection of neurotoxins in carnivorous reef fish from the coast of Cameroon, West Africa. *African Journal of Marine Science*, 30 : 533-540.
- Blythe D.G., Fleming L.E., Ayyar D.R., 1994. Mannitol therapy for acute and chronic ciguatera fish poisoning. *Memoirs of the Queensland Museum*, Brisbane, 34 : 465-470.
- Boisier P., Ranaivoson G., Rasolofonirina N., Andriamahefazafy B., Roux J., Chanteau S., Satake M., Takeshi Y., 1995. Fatal mass poisoning in Madagascar following ingestion of a shark (*Carcharhinus leucas*): Clinical and epidemiological aspects and isolation of toxins. *Toxicon*, 33 : 1359-1364.
- Bomber J.W., Guillard R.R.L., Nelson W.G., 1988. Roles of temperature, salinity and light in seasonality, growth and toxicity of ciguatera-causing *Gambierdiscus toxicus* Adachi et Fukuyo (Dinophyceae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 115:53-65.
- Bottein-Dechraoui M.Y., Tiedeken J.A., Persad R., Wang Z., Granade H.R., Dickey R.W., Ramsdell J.S., 2005. Use of two detection methods to discriminate ciguatoxins from brevetoxins: application to great barracuda from Florida Keys. *Toxicon*, 46 : 261-270.
- Boydrone R., 2004. Ciguatéra et détection: point et perspectives. *Thèse de doctorat en pharmacie*. Université de Nantes.
- Boydrone-Le Garrec R., Benoit E., Sauviat M.P., Lewis R.J., Molgó J., Laurent D., 2005. Ability of some plant extracts, traditionally used to treat ciguatera fish poisoning, to prevent the *in vitro* neurotoxicity produced by sodium channel activators. *Toxicon*, 46 : 625-634.
- Boydrone-Le Garrec R. 2005. Evaluation du potentiel thérapeutique de plantes traditionnellement utilisées dans le Pacifique pour traiter l'intoxication ciguatérique. *Thèse en Science du Vivant*. Université de la Nouvelle-Calédonie, Nouméa.
- Braley R.D., 1989. Giant clam stock survey and preliminary investigation of pearl oyster resources in the Tokelau Islands. ACIAR Giant Clam Project. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*.
- Bruslé J., 1997. Ciguatera fish poisoning – a review. Sanitary and economic aspects, *Les éditions INSERM*, Paris, France, 147 p.
- Cadel-Six S., Peyraud-Thomas C., Brient L., de Marsac N.T., Rippka R., Méjean A., 2007. Different genotypes of anatoxin-producing cyanobacteria co-exist in the Tarn river, France. *Applied Environmental Microbiology*, 75 : 7605-7614.

- Caillaud A., Yasumoto T., Diogène J., 2010. Detection and quantification of maitotoxin-like compounds using a neuroblastoma (Neuro-2a) cell based assay. Application to the screening of maitotoxin-like compounds in *Gambierdiscus* spp. *Toxicon*, 56(1) : 36-44.
- Caire J.F., Raymond, A., Bagnis, R., 1985. Ciguatera : study of the setting-up and the evolution of *Gambierdiscus toxicus* population on an artificial substrate introduced in an atoll lagoon with follow-up of associated environmental factors. *Proceedings of the 5th International Coral Reef Congress*, Tahiti, 429-435.
- Camoin G.F. and Gautret P., 2006. Microbialites and microbial communities: Biological diversity, biogeochemical functioning, diagenetic processes, tracers of environmental changes. *Sedimentary Geology*, 185 : 127-130.
- Capone D.G., Zehr J.P., Paerl H., Bergman B., Carpenter E.J., 1997. *Trichodesmium*, a globally significant marine cyanobacterium. *Science*, 276 : 1221-1229.
- Capper A., Tibbetts I.R., O'Neil J.M., Shaw G.R., 2005. The fate of *Lyngbya majuscula* toxins in three potential consumers. *Journal of Chemical Ecology*, 31(7) : 1595-1606.
- Capper A., Tibbetts I.R., O'Neil J.M., Shaw G.R., 2006. Feeding preference and deterrence in rabbitfish *Siganus fuscescens* for the cyanobacterium *Lyngbya majuscula* in Moreton Bay, south-east Queensland, Australia. *Journal of Fish Biology*, 68(5) : 1589-1609.
- Capper A., Cruz-Rivera E., Paul V.J., Tibbetts I.R., 2006. Chemical deterrence of a marine cyanobacterium against sympatric and non-sympatric consumers. *Hydrobiologia*, 553 : 319-326.
- Capper A. and Paul V. J., 2008. Grazer interactions with four species of *Lyngbya* in southeast Florida. *Harmful Algae*, 7 :717-728.
- Carmichael W.W., Evans W.R., Yin Q. Q., Bell P., Moczydowski E., 1997. Evidence for Paralytic Shellfish Poisons in the freshwater cyanobacterium *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) comb. nov.. *Applied and Environmental Microbiology* 63(8) : 3104-3110.
- Carpenter E.J., O'Neil J., Dawson R., Capone D.G., Siddiqui P.J.A., Roenneberg T., Bergman B., 1993. The tropical diazotrophic phytoplankton *Trichodesmium*: biological characteristics of two common species. *Marine Ecology Progress Series*, 95(3) : 295-304.
- Carpenter E.J., Subramaniam A., Capone D.G., 2004. Biomass and primary productivity of the cyanobacterium *Trichodesmium* spp. in the tropical N Atlantic Ocean. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 51(2) : 173-203.
- Center for Disease Control and prevention, 1998. Ciguatera Fish Poisoning – Texas, 1997. *Journal of American Medical Association*, 280(16).
- Champetier de Ribes G., Rasolofonirina R.N., Ranaivoson G., Razafimahafa N., Rakotoson J.D., Rabeson D., 1997. Intoxications par animaux marins vénéneux à Madagascar (ichtyosarcotoxisme et chélonitoxisme) : données épidémiologiques récentes. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, 90 : 268-172.
- Chanteau S., Lechat I., Bagnis R., 1981. Essai de détection de la ciguatoxine par une méthode immunoenzymatique. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, 74 : 227-232.
- Charpy L., Alliot R., Rodier M., Golubic S., 2007. Benthic nitrogen fixation in the SW New Caledonia lagoon. *Aquatic Microbial Ecology*, 47(1) : 73-81.
- Château-Degat M.L., 2003. Les toxines marines: problèmes de santé en émergence. VertigO-la revue en sciences de l'environnement sur le WEB, 4 : 1-11.

- Château-Degat M.L., Chinain M., Cerf N., Gingras S., Hubert B., Dewailly E., 2005. Seawater temperature, *Gambierdiscus* spp. variability and incidence of ciguatera poisoning in French Polynesia. *Harmful Algae*, 4 : 1053-1062.
- Château-Degat M.L., Dewailly E., Cerf N., Nguyen N.L., Huin-Blondey M.O., Hubert B., Laudon F., Chansin R., 2007. Temporal trends and epidemiological aspects of ciguatera in French Polynesia: a 10-year analysis. *Tropical Medicine et International Health*, 12 : 485-492.
- Château-Degat M.L., Chinain M., Darius T., Dewailly E., Mallet H.P., 2009. Surveillance épidémiologique de la ciguatera en Polynésie française. *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire, Institut de veille Sanitaire*, 48-49-50 : 522-525.
- Chen Y.B., Zehr J.P., Mellon M., 1996. Growth and nitrogen fixation of the diazotrophic filamentous nonheterocystous cyanobacterium *Trichodesmium* sp. IMS 101 in defined media: evidence for a circadian rhythm. *Journal of Phycology*, 32:916-923.
- Chinain M., Germain M., Deparis X., Pauillac S., Legrand A.M., 1999(a). Seasonal abundance and toxicity of the dinoflagellate *Gambierdiscus* spp. (Dinophyceae), the causative agent of Ciguatera in Tahiti, French Polynesia. *Marine Biology*, 135 : 259-267.
- Chinain M., Germain M., Seguin F., Pauillac S., Legrand A.M., 1997. Intraspecific variation in the ciguatera-causing dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *Toxicon*, 35 : 1662-1662.
- Chinain M., Faust M.A., Pauillac S., 1999(b). Morphology and molecular analyses of three toxic species of *Gambierdiscus* (Dinophyceae): *G. pacificus*, sp. nov., *G. australis*, sp. nov. and *G. polynesiensis*, sp. nov. *Journal of Phycology*, 35 : 1282-1296.
- Chinain M., Darius T., Ung A., Tchou Fouc M., Revel T., Cruchet P., Pauillac S., Laurent D., 2010(a). Ciguatera risk management in French Polynesia: The case study of Raivavae Island (Australes Archipelago). *Toxicon*, doi : 10.1016/j.toxicon.2009.05.032.
- Chinain M., Darius T., Ung A., Cruchet P., Wang Z., Ponton D., Laurent D., Pauillac S., 2010(b). Growth and toxin production in the ciguatera-causing dinoflagellate *Gambierdiscus polynesiensis* (Dinophyceae) in culture. *Toxicon*, doi : 10.1016/j.toxicon.2009.06.013.
- Chisholm C., 1808. On the poison of fish. *Edinburgh Medical and Surgical Journal*, 4 : 396-422.
- Chungue E., 1977. Les toxines des Scaridés. *Thèse de doctorat en Science, Spécialité Biochimie*, Université de Montpellier.
- Chungue E., Bagnis R., Parc F., 1984. The use of mosquitoes (*Aedes aegypti*) to detect ciguatoxin in surgeon fishes (*Ctenochaetus striatus*). *Toxicon*, 22 : 161-164.
- Ciminiello P., Dell'Aversano C., Fattorusso E., Forino M., Magno G.S., Tartaglione L., Grillo C., Melchiorre N., 2006. The Genoa 2005 outbreak. Determination of putative Palytoxin in Mediterranean *Ostreopsis ovata* by a new Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry. *Method of Analytical Chemistry*, 78(17) : 6153-6159.
- Codd G.A., Steffensen D.A., Burch M.D., Baker P.D., 1994. Toxic blooms of cyanobacteria in Lake Alexandrina, South Australia. *Marine and Freshwater Research*, 45 : 731-736.
- Codd G.A., 2000. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. *Ecological Engineering*, 16(1) :51-60.
- Conand C., 1989. Les holothuries aspidochirotes du lagon de Nouvelle-Calédonie : biologie, écologie et exploitation. *Thèse en Sciences Naturelles*, Université de Bretagne Occidentale Brest.

- Cronberg G. and Annadotter H., 2006. Manual on aquatic cyanobacteria. A photo guide and a synopsis of their toxicology. *Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, and International Society for the Study of Harmful Algae*, Copenhagen.
- Cruz-Rivera E. and Villareal T.A., 2006. Macroalgal palatability and the flux of ciguatera toxins through marine food webs. *Harmful Algae*, 5 : 497-525.
- Cuypers E., Yanagihara A., Rainier J.D., Tytgat J., 2007. TRPV1 as a key determinant in ciguatera and neurotoxic shellfish poisoning. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 361 : 214-217.
- Cuypers E., Abdel-Mottaleb Y., Kopljari I., Rainier J.D., Raes A.L., Snyders D.J., Tytgat J., 2008. Gambierol, a toxin produced by the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*, is a potent blocker of voltage-gated potassium channels. *Toxicon*, 51 : 974-983.
- Darius H.T., Ponton D., Revel T., Cruchet P., Ung A., Tchou Fouc M., Chinain M., 2007. Ciguatera risk assessment in two toxic sites of French Polynesia using the receptor-binding assay. *Toxicon*, 50 : 612-626.
- David G., 1991. La pêche dans les petits territoires insulaires du Pacifique sud : situation actuelle et perspectives. *La Revue Maritime*, 421 : 20-37.
- Dawson E.Y., Aleem A.A., Halstead B.W., 1955. Marine algae from Palmyra Island with special reference to the feeding habits and toxicology of reef fishes. *Allan Hancock Foundation Occasional Papers*, 17 : 39p.
- Dawson E.Y., 1959. Changes in Palmyra Atoll and its vegetation through the activities of man, 1913-1958. *Pacific Naturalist*, 1 : 1-52.
- de Haro L., 2008. Intoxications par organismes marins. *Médecine Tropicale*, 68 : 367-374.
- de la Rosa L., Alvarez-Parrilla E., Martinez-martinez A., 2007. Biochemistry of maitotoxin. In Botana L.M., editor. *Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry*. Blackwell publishing, p. 55-73.
- Dechraoui M.Y., Naar J., Pauillac S., Legrand A.M., 1999. Ciguatoxins and brevetoxins, neurotoxic polyether compounds active on sodium channels. *Toxicon*, 37(1) : 125-143.
- Dechraoui-Bottein M.Y., 1999. Etude du mode d'action des ciguatoxines, biotoxines marines responsables de la ciguatera : comparaison aux brévetoxines et application à la détection des poissons toxiques. *Thèse en Sciences Médicales, Toxicologie*. Université française du Pacifique (Polynésie française), Papeete.
- Deeds J.R. and Schwartz M.D., 2009. Human risk associated with palytoxin exposure. *Toxicon*, 56 : 150-162.
- Dennison W., O'Neil J., Duffy E., Oliver P., Shaw G., 1999. Blooms of the cyanobacterium *Lyngbya majuscula* in coastal waters of Queensland, Australia. *Bulletin de l'Institut Océanographique de Monaco*, p. 501-506.
- Dewailly E., Château-Degat M.L., Suhas E., 2008. Fish consumption and health in French Polynesia. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 17(1) : 86-93.
- Dickey R.W., Bobzin S.C., Faulkner D.J., Bencsath F.A., Andrzejewski D., 1990. Identification of okadaic acid from a Caribbean dinoflagellate, *Prorocentrum concavum*. *Toxicon*, 28 : 371-377.
- Dickey R.W., Granade H.R., MacClure F.D., 1994. Evaluation of a solid-phase immunobead assay for detection of ciguatera-related biotoxins in Caribbean finfish. *Memoirs of Queensland Museum*, 34(3) : 481-488.

- Dickey R.W. and Plakas S.M., 2010. Ciguatera: A public health perspective. *Toxicon*, 56 : 123-136.
- Dupon J.F., 1993. Enjeux et défis de l'utilisation des littoraux dans le Pacifique insulaire, *Acta Geographica*, 2(94) : 11-24.
- Dupouy C., 1992. Discoloured waters in the Melanesian archipelago (New Caledonia and Vanuatu). The value of the Nimbus-7 Coastal Zone Colour Scanner observations. In Carpenter E.J., Capone D.G., Rueter J.G., editors. *Marine pelagic cyanobacteria: Trichodesmium and other diazotrophs*. NATO AS1 Series C. V. - Kluwer Academic, Dordrecht, p.177-191.
- Dupouy C., Neveux J., Ouillon S., Frouin R., Murakami H., Hochard S., Dirberg G., 2010. Satellite retrieval of chlorophyll concentration in the lagoon and open ocean waters of New Caledonia. *Marine Pollution Bulletin*, special issue on New Caledonia lagoons, doi : 10.1016/j.marpolbul.2010.06.039.
- Durand-Clément M., 1986. A study of toxin production by *Gambierdiscus toxicus* in culture. *Toxicon*, 24 : 1153-1157.
- Endean R., Monks S.A., Griffith J.K., Llewellyn L.E., 1993. Apparent relationships between toxins elaborated by the cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum* and those present in the flesh of the narrow-barred Spanish mackerel *Scomberomorus commersoni*. *Toxicon*, 31 : 1155-1165.
- Falconer I.R., 2005. Cyanobacterial toxins of drinking water supplies: cylindrospermopsins and microcystins: *CRC Press*.
- FAO, 2004. Marine Biotoxins. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. *Food and Nutrition paper 80*. 278 p.
- Faust M.A., 1995. Observation of sand-swelling toxic dinoflagellates (*dinophyceae*) from widely differing sites, including two new species. *Journal of Phycology*, 31 : 996-1003.
- Faust M.A., 2009. Ciguatera-Causing Dinoflagellates in a Coral-Reef Mangrove Ecosystem, Belize. *Atoll Research Bulletin*, 569 : 1-32.
- Fleming L.E., Broad K., Clement A., Dewailly E., Elmir S., Knap A., Pomponi S.A., Smith S., Solo Gabriele H., Walsh P., 2006. Oceans and human health: Emerging public health risks in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 53:545-560.
- Frémy J.M. et Lassus P. (coordinateurs), 2001. Toxines d'algues dans l'alimentation. *IFREMER-AFSSA*.
- Friedman M., Fleming L., Fernandez M., Bienfang P., Schrank K., Dickey R., Bottein M.Y., Backer L., Ayyar R., Weisman R., Watkins S., Granade R., Reich A., 2008. Ciguatera Fish Poisoning : Treatment, Prevention and Management. *Marine Drugs*, 6 : 456-479.
- Furey A., Allis O., Ortea P.M., Lehane M., James K.J., 2008. Hepatotoxins: Context and Chemical Determination. In Botana L.M., editor. *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection* (Food Science and Technology). 2 ed: CRC Press, p. 845-886.
- Fussy A., Pommier P., Lumbroso C., de Haro L., 2007. Chelonitoxism : New case reports in French Polynesia and review of the literature. *Toxicon*, 49 : 827-832.
- Gago-Martinez A. 2007. Hepatotoxic cyanobacteria. In Botana L.M., editor. *Phycotoxins : Chemistry and Biochemistry*. Blackwell publishing, p. 251-273.
- Gatti C., Oelher E., Legrand A.M., 2008. Severe seafood poisoning in French Polynesia: A retrospective analysis of 129 medical files. *Toxicon*, 51 : 746-753.
- Glaziou P., and Martin P.M.V., 1993. Study of factors that influence the clinical response to ciguatera fish poisoning. *Toxicon*, 31 :1151-1154.

- Glaziou P. and Legrand A.M., 1994. The epidemiology of ciguatera fish poisoning. *Toxicon*, 32 : 863-873.
- Gleibs S., Mebs D., Werding B., 1995. Studies on the origin and distribution of palytoxin in a Caribbean coral reef. *Toxicon*, 33 :1531-1537.
- Gleibs S. and Mebs D., 1999. Distribution and sequestration of palytoxin in coral reef animals. *Toxicon*, 37 : 1521-1527.
- Golubic S., M.M. Abed R., Palinska K., Pauillac S., Chinain M., Laurent D., 2009. Marine toxic cyanobacteria: Diversity, environmental responses and hazards. *Toxicon*, doi :10.1016/j.toxicon.2009.07.023.
- Guerrini F., Pezzolesi L., Feller A., Riccardi M., Ciminiello P., Dell'Aversano C., Tartaglione L., Lacovo E.D., Fattorusso E., Forino M., Pistocchi R., 2010. Comparative growth and toxin profile of cultured *Ostreopsis ovata* from the Tyrrhenian and Adriatic Seas. *Toxicon*, 55 : 211-220.
- Gugger M., Lenoir S., Berger C., Ledreux A., Druart J.C., Humbert J.F., Guette C., Bernard C., 2005. First report in a river in France of the benthic cyanobacterium *Phormidium favosum* producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis. *Toxicon*, 45 : 919-928.
- Guo C. and Tester P.A., 1994. Toxic effect of the bloom-forming *Trichodesmium* sp. (cyanophyta) to the copepod *Acartia tonsa*. *Natural Toxins*, 2(4) : 222-227.
- Hahn S.T. and Capra M.F., 1992. The cyanobacterium *Oscillatoria erythraea*--a potential source of toxin in the ciguatera food-chain. *Food additives and contaminants*, 9 : 351-355.
- Hahn S.T. and Capra. M.F., 2003. Fishborne illnesses: Scombroid and ciguatera poisoning. In Hocking A.D., editor. AIFST (2003). *Foodborne Microorganisms of Public Health Significance*. Australian Institute of Food Science and Technology, Waterloo, p. 689-702.
- Hales S., Weinstein P., Woodward A., 1999. Ciguatera fish poisoning, El Nino, and sea surface temperature. *Ecosystem Health*, 5 :20-25.
- Halstead B.W., 1965. Poisonous and venomous marine animals of the world. Washington, DC: U.S. Government Printing Office, vol. II, Invertebrates : 549-562.
- Hamilton B., Hurbungs M., Vernoux J.P., Jones A., Lewis R.J., 2002. Isolation and characterisation of Indian Ocean ciguatoxin. *Toxicon*, 40 : 685-693.
- Hamilton B., Whittle N., Shaw G., Eaglesham G., Moore M.R., Lewis R.J., 2009. Human fatality associated with Pacific ciguatoxin contaminated fish. *Toxicon*, doi :10.1016/j.toxicon.2009.06.007.
- Hansen G., Turquet J., Quod J.P., Ten-Hage L., Lugomela C., Kyewalyanga M., Hurbung M., Wawiye P., Ogongo B., Tunje S., Rakotoarinjanahary H., 2001. Potentially harmful algae of the western Indian Ocean - a short guide based on a preliminary survey. *IOC Technical Series UNESCO*, 41 : 105 p.
- Hawser S.P., Capone D.G., Carpenter E.J. 1991. A neurotoxic factor associated with the bloom-forming cyanobacterium *Trichodesmium*. *Toxicon*, 29 : 227-278.
- Hawser S.P. and Codd G.A., 1992. The toxicity of *Trichodesmium* blooms from Caribbean waters. In Carpenter EJ, Capone D.G., Rueter, J.G., editor. *Marine pelagic cyanobacteria: Trichodesmium and other diazotrophs* : Kluwer Academic Publishers, p 319-329.
- Hawser S.P., O'Neil J.M., Roman M.R., Codd G.A., 1992. Toxicity of blooms of the cyanobacterium *Trichodesmium* to zooplankton. *Journal of Applied Phycology*, 4 : 79-86.
- Hirama M., Oishi T., Uehara H., Inoue M., Maruyama M., Oguri H., Satake M., 2001. Total Synthesis of Ciguatoxin CTX-3C. *Science*, 294 : 1904-1907.

- Hoffmann L., 1999. Marine cyanobacteria in tropical regions : diversity and ecology. *European Journal of Phycology*, 34 : 371-379.
- Hokama Y., Banner A.H., Boylan D.B., 1977. A radioimmunoassay for the detection of ciguatoxin. *Toxicon*, 15 : 317-325.
- Hokama Y., Takenaka W.E., Nishimura K.L., Ebisu J.S.M., Bourke R., Sullivan P.K., 1998. A simple membrane immunobead assay for detecting ciguatoxin and related polyethers from human ciguatera intoxication and natural reef fishes. *AOAC International*, Gaithersburg, MD, Etats-Unis.
- Holmes M.J., 1998. *Gambierdiscus yasumotoi* sp. nov. (Dinophyceae), a toxic benthic dinoflagellate from southeastern Asia. *Journal of Phycology*, 34 : 661-668.
- Humbert J.F., 2001. Déterminisme des efflorescences de cyanobactéries en milieu aquatique. In Explorer, exploiter les toxines et maîtriser les organismes producteurs, *Rencontres en toxinologie SFET*. Elsevier, Paris, p.53-62.
- Humbert J.F., Bérard A., Leboulanger C., 2001. Impact écologique des cyanobactéries des eaux douces et saumâtres. In Frémy J.M. et Lassus P., editors. *Toxines d'algues dans l'alimentation*, IFREMER-AFFSSA, p.89-108.
- Hungerford J.M., 2010. Scombroid poisoning : A review. *Toxicon*, doi : 10.1016 /j.toxicon.2010.02 .006.
- Hwang D.F., 2003. Studies on toxic substances implicated to fishery food poisoning in Taiwan. *Journal of the Fisheries Society of Taiwan*, 30 : 185-197.
- Ifremer, 2006. Guide pour les toxines paralysantes. 6p.
- Inoue M., Hirama M., Satake M., Sugiyama K., Yasumoto T., 2003. Inhibition of brevetoxin binding to the voltage-gated sodium channel by gambierol and gambieric acid-A. *Toxicon*, 41 : 469-474.
- Inoue M., Lee N., Tsumuraya T., Fujii I., Hirama M., 2009. Use of monoclonal antibodies as an effective strategy for treatment of ciguatera poisoning. *Toxicon*, 53 : 802-805.
- Ito B.M., Uchida R.N., Shirai L.K., Abad M.A., Kimura L.H., Hokama Y., 1983. Radioimmunoassay results of ciguatera analysis of fishes in the northwestern Hawaiian Islands, 1980-81. Proceeding of the second symposium on resource investigations in the northwestern. *Hawaiian Islands*, 2.
- Ito E., Satake M., Yasumoto T., 2002. Pathological effects of lyngbyatoxin A upon mice. *Toxicon*, 40 : 551-556.
- Ito E., Suzuki-Toyota F., Toshimori K., Fuwa H., Tachibana K., Satake M., Sasaki M., 2003. Pathological effects on mice by gambierol, possibly one of the ciguatera toxins. *Toxicon*, 42 : 733-740.
- Jaeg J.P., 2007. Microcystines : intoxication des animaux domestiques et sécurité des aliments d'origine animale. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 158 : 13.
- James K.J., Crowley J., Duphard J., Lehane M., Furey A. 2007. Anatoxin-a and analogues : discovery, distribution, and toxicology. In Botana L.M., editor. *Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry*. Blackwell publishing, p. 141-158.
- Janson S., Siddiqui P.J.A., Walsby A.E., Romans K.M., Carpenter E.J., Bergman B., 1995. Cytomorphological characterization of the planktonic diazotrophic cyanobacteria *Trichodesmium* spp. from the Indian Ocean and Caribbean and Sargasso seas. *Journal of Phycology*, 31 : 463-477.
- Janson S., Bergman B., Carpenter E.J., Giovannoni S.J., Vergin K., 1999. Genetic analysis of natural populations of the marine diazotrophic cyanobacterium *Trichodesmium*. *FEMS Microbiology Letters*, 30 : 57-65.

- Jellett J., Marks L.J., Stewart J.E., Dorey M.L., Watson-Wright W., Lawrence J.F., 1992. Paralytic shellfish poison (saxitoxin family) bioassays : Automated endpoint determination and standardization of the *in vitro* tissue culture bioassay, and comparison with the standard mouse bioassay. *Toxicon*, 30 : 1143-1156.
- Jones G.B., 1992. Effect of *Trichodesmium* blooms on water quality in the Great Barrier Reef lagoon. In Carpenter E.J., Capone D.G., Rueter J.G., editors. *Marine pelagic cyanobacteria : Trichodesmium and other diazotrophs*. NATO AS1 Series C. V. - Kluwer Academic, Dordrecht, p. 273-287.
- Kanno K., Kotaki Y., Yasumoto T., 1976. Distribution of toxins in molluscs associated with coral reefs. *Bulletin of the Japanese society of scientific fisheries*, 42 : 1395-1398.
- Katikou P., 2007. Chemistry of palytoxins and ostreocins. In Botana L.M., editor. *Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry*. Blackwell publishing, p. 75-93.
- Katikou P., 2008. Palytoxins and analogues: ecobiology and origin, chemistry, metabolism and chemical analysis. In Botana L.M., editor. *Phycotoxins : Chemistry and Biochemistry*, 2nd Edition. Blackwell publishing, p. 631-663.
- Kigoshi H., Kanematsu K., Uemura D., 1999. Turbotoxins A and B, novel diiodotyramine derivatives from the Japanese gastropod *Turbo marmorata*. *Tetrahedron Letters*, 40 : 5745-5748.
- Kigoshi H., Kanematsu K., Yokota K., Uemura D., 2000. Turbotoxins A and B, Novel Diiodotyramine Derivatives from the Japanese Gastropod *Turbo marmorata*. *Tetrahedron*, 56 : 9063-9070.
- Kirkpatrick B., Fleming L.E., Squicciarini D., Backer L.C., Clark R., Abraham W., Benson J., Cheng Y.S., Johnson D., Pierce R., Zaias J., Bossart G.D., Baden, D., 2004. Literature review of Florida red tide : implications for human health effects. *Harmful Algae*, 3 : 99-115.
- Kirkpatrick B., Fleming L.E., Backer L.C., Bean J.A., Tamer R., Kirkpatrick G., Kane T., Wanner A., Dalpra D., Reich A., Baden D.G., 2006. Environmental exposures to Florida red tides : Effects on emergency room respiratory diagnoses admissions. *Harmful Algae*, 5 : 526-533.
- Kirkpatrick B., Currier R., Nierenberg K., Reich A., Backer L.C., Stumpf R., Fleming L., Kirkpatrick G., 2008. Florida red tide and human health : A pilot beach conditions reporting system to minimize human exposure. *Science of The Total Environment*, 402(1) : 1-8.
- Kobayashi S., Alizadeh B.H., Sasaki S.Y., Oguri H., Hirama M., 2004. Synthesis of the Fully Functionalized ABCDE Ring Moiety of Ciguatoxin. *Organic Letters*, 6 : 751-754.
- Kodama A.M., Hokohama Y., Yasumoto T., Fukui M., Manea S.J., Sutherland N., 1989. Clinical and laboratory findings implicating palytoxin as cause of ciguatera poisoning due to *Decapterus macrosoma* (mackerel). *Toxicon*, 27 : 1051-1053.
- Kogure K., Tamplin M.L., Simidu U. et Colwell R., 1988. A tissue culture assay for tetrodotoxin, saxitoxin and related toxins. *Toxicon*, 26 : 191-197.
- Krishnan A.A., Krishnakumar P.K., Rajagopalan M., 2007. *Trichodesmium erythraeum* (Ehrenberg) bloom along the southwest coast of India (Arabian Sea) and its impact on trace metal concentrations in seawater. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 71(3-4) : 641-646.
- Krys S., Hossen V., Trottereau S., Biré. R., 2010. Biotoxines marines lipophiles : évolution des modalités de surveillance des coquillages, mise en place d'une méthode chimique en complément du bio-essai sur souris. *EuroReference*, 3 : 12-15.

- Kuiper-Goodman T., Falconer I., Fitzgerald J., 1999. Human Health aspects. In: Chorus I., Bartram J., editors. *Toxic cyanobacteria in water : a guide to their public health consequences monitoring and management*. London : E and FN Spon.
- Kumar-Roiné S., Matsui M., Chinain M., Laurent D., Pauillac S., 2008. Modulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in RAW 264.7 murine macrophages by Pacific ciguatoxin. *Nitric Oxide*, 19 : 21-28.
- Kumar-Roiné S., Matsui M., Reybier K., Darius T., Chinain M., Pauillac S., Laurent D., 2009. Ability of certain plant extracts traditionally used to treat ciguatera fish poisoning to inhibit nitric oxide production in RAW264.7 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, 123 : 369-377.
- Kumar-Roiné, S. 2009. Valorisation de remèdes traditionnels utilisés dans le traitement de la ciguatéra dans le Pacifique. *Thèse en Science du Vivant*. Université de Nouvelle-Calédonie, Nouméa.
- Labrousse H. and Matile L., 1996. Toxicological biotest on Diptera larvae to detect ciguatoxins and various other toxic substances. *Toxicon*, 34 : 881-891.
- Laigret J., Parc F., Chanteau S., Ducousoo R., Lafon M., Bagnis R., Lechat L., 1981. Détection radio-immunologique directe de la ciguatoxine dans les tissus pisciaires : absence actuelle d'immunsérum spécifique. *Médecine et Armées*, 9 : 337-339.
- Laurent D., 1993. La ciguatera : une intoxication liée à la consommation de poissons tropicaux. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, 73 : 7-19.
- Laurent D., Bourdy G., Amade P., Cabalion P., Bourret D., 1993. La gratte ou ciguatera : ses remèdes traditionnels dans le Pacifique Sud. *ORSTOM Editions*, Paris, pp. 51-116.
- Laurent D., Kerbrat A.S., Darius H.T., Girard E., Golubic S., Benoit E., Sauviat M.P., Chinain M., Molgo J., Pauillac S., 2008. Are cyanobacteria involved in Ciguatera Fish Poisoning-like outbreaks in New Caledonia? *Harmful Algae*, 7 : 827-838.
- Lavoie I., Laurion I., Warren A., Vincent W.F., 2007. Les fleurs d'eau de cyanobactéries, revue de littérature. *INRS rapport*, n° 916, xiii, 124 p.
- Lawrence D., Enriquez M.B., Lumish R. et Maceo A., 1980. Ciguatera fish poisoning in Miami. *Journal of the American Medical Association*, 244 : 254-258.
- Lawton L., Marsalek B., Padisák J., Chorus I., 1999. Determination of cyanobacteria in the laboratory. In: Chorus I., Bartram J., editors. *Toxic Cyanobacteria in Water : A guide to their public health consequences, monitoring and management*. E and FN Spon.
- Ledreux A., Krys S., Bernard C., 2009. Suitability of the Neuro-2a cell line for the detection of palytoxin and analogues (neurotoxic phycotoxins). *Toxicon*, 53 : 300-308.
- Legrand A.M., Galonnier M., Bagnis R., 1982. Studies on the mode of action of ciguateric toxins. *Toxicon*, 20 : 311-315.
- Legrand A.M. et Bagnis R., 1991. La ciguatera : un phénomène d'écotoxicologie des récifs coralliens. *Annales de l'Institut Pasteur*, 2253-2266.
- Lehane L. and Lewis R.J., 2000. Ciguatera: recent advances but the risk remains. *International Journal of Food Microbiology*, 61 : 91-125.
- Lenoir S., Ten-Hage L., Turquet J., Quod J.-P., Bernard C., Hennion M.C., 2004. First evidence of palytoxin analogues from an *Ostreopsis maccarenensis* (Dinophyceae) benthic bloom in southwestern Indian Ocean. *International Journal of Food Microbiology*, 40 : 1042-1051.

- Levitian O., Brown C.M., Sudhaus S., Campbell D., LaRoche J., Berman-Frank I., 2010. Regulation of nitrogen metabolism in the marine diazotroph *Trichodesmium* IMS 101 under varying temperatures and atmospheric CO₂ concentrations. *Environmental Microbiology*, doi : 10.1111/j.1462-2920.2010.02195.x.
- Lewis R.J., Sellin M., Poli M.A., Norton R.S., MacLeod J.K., Sheil M.M., 1991. Purification and characterization of ciguatoxins from moray eel (*Lycodontis javanicus*, Muraenidae). *Toxicon*, 29 : 1115-1127.
- Lewis R.J. and Holmes M.J., 1993. Origin and transfer of toxins involved in ciguatera. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 106 : 615-628
- Lewis R.J. and Ruff T.A., 1993. Ciguatera : Ecological, clinical, and socioeconomic perspectives. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 23 : 137-156.
- Lewis R.J., Vernoux J.-P., Brereton I.M., 1998. Structure of Caribbean ciguatoxin isolated from Caranx latus. *Journal of American Chemical Society*, 120 : 5914-5920
- Lewis R.J., Jones A., Vernoux J.P., 1998. HPLC/Tandem Electrospray Mass Spectrometry for the Determination of Sub-ppb Levels of Pacific and Caribbean Ciguatoxins in Crude Extracts of Fish. *Analytical Chemistry*, 71 : 247-250.
- Lewis R.J., Molgo J., Adams D.J., 2000. Pharmacology of toxins involved in Ciguatera and related fish poisonings. In: Seafood toxicity. In Botana L.M., editor. *Seafood and Freshwater Toxins : Pharmacology, Physiology, and Detection*. Food Science and Technology, p 419-447.
- Lewis R.J., 2006. Ciguatera : Australian perspectives on a global problem. *Toxicon*, 48 : 799-809.
- Lewis R.J., Yang A., Jones A., 2009. Rapid extraction combined with LC-tandem mass spectrometry (CREM-LC/MS/MS) for the determination of ciguatoxins in ciguateric fish flesh. *Toxicon*, 54 : 62-66.
- Litaker R.W., Vandersea M.W., Faust M.A., Kibler S.R., Chinain M., Holmes M.J., Holland W.C., Tester P.A., 2009. Taxonomy of *Gambierdiscus* including four new species, *Gambierdiscus caribaeus*, *Gambierdiscus carolinianus*, *Gambierdiscus carpenteri* and *Gambierdiscus ruetzleri* (Gonyaulacales, Dinophyceae). *Phycologia*, 48 : 344-390.
- Litaker R.W., Vandersea M.W., Faust M.A., Kibler S.R., Nau A.W., Holland W.C., Chinain M., Holmes M.J., Tester P.A., 2010. Global distribution of ciguatera causing dinoflagellates in the genus *Gambierdiscus*. *Toxicon*, doi:10.1016/j.toxicon.2010.05.017.
- Llewellyn L., Negri A., Roberston A., 2006. Paralytic shellfish toxins in the tropical oceans. *Toxin Reviews*, 25 : 159-196.
- Llewellyn L.E., 2009. Revisiting the association between sea surface temperature and the epidemiology of fish poisoning in the South Pacific : Reassessing the link between ciguatera and climate change. *Toxicon*, doi:10.1016/j.toxicon.2009.08.011.
- Lombet A., Bidard J.N., Lazdunski M., 1987. Ciguatoxin and brevetoxins share a common receptor site on the neuronal voltage-dependant Na⁺ channel. *Federation of European Biochemical Societies*, 219 : 355-359.
- Manger R., Leja S.L., Lee S.Y., Hungerford J., Wekell M., 1993. Tetrazolium-based cell bioassay for neurotoxins active on voltage-sensitive sodium channels : semiautomated assay for saxitoxins, brevetoxins, and ciguatoxins. *Analytical Biochemistry*, 214 : 190-194.
- Manger R., Leja S.L., Lee S.Y., Hungerford J., Hokama Y., Dickey R.W., Granade H.G., Lewis R., Yasumoto T., Wekell M., 1995. Detection of sodium channel toxin: directed cytotoxicity assays of purified

- ciguatoxins, brevetoxins, saxitoxins, and seafood extracts. *Journal of AOAC International*, 78(2) : 521-527.
- Matsui M. 2009. Rôle des cytokines dans la ciguatera : application à l'étude de remèdes traditionnels du Pacifique. *Thèse en Science du Vivant*. Université de Nouvelle-Calédonie, Nouméa.
- Matsui M., Kumar-Roiné S., Darius H.T., Chinain M., Laurent D., Pauillac S., 2009. Characterisation of the anti-inflammatory potential of *Vitex trifolia* L. (*Labiateae*), a multipurpose plant of the Pacific traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 126 : 427-433.
- Mazur-Marzec H., 2006. Characterization of phycotoxins produced by cyanobacteria. *International Journal of Oceanography and Hydrobiology*, 35 : 85-109.
- McElhiney J., Lawton L.A., Edwards C., Susan G., 1998. Development of a bioassay employing the desert locust (*Schistocerca gregaria*) for the detection of saxitoxin and related compounds in cyanobacteria and shellfish. *Toxicon*, 36 : 417-420.
- Méjean A., Peyraud-Thomas C., Kerbrat A.S., Golubic S., Pauillac S., Chinain M., Laurent D., 2009. First identification of the neurotoxin homoanatoxin-a from mats of *Hydrocoleum lyngbyaceum* (marine cyanobacterium) possibly linked to giant clam poisoning in New Caledonia. *Toxicon*, doi : 10.1016/j.toxicon.2009.10.029.
- Moore R.E. and Scheuer P.J., 1971. Palytoxin : a new marine toxin from a coelenterate. *Science*, 172 : 495-498.
- Morohashi A., Satake M., Yasumoto T., 1998. The absolute configuration of gambierol, a toxic marine polyether from the dinoflagellate, *Gambierdiscus toxicus*. *Tetrahedron Letters*, 39 : 97-100.
- Morohashi A., Satake M., Nagai H., Oshima Y., Yasumoto T., 2000. The absolute configuration of gambieric acids A-D, potent antifungal polyethers, isolated from the marine dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *Tetrahedron*, 56 : 8995-9001.
- Morton S.L., Norris D.R., Bomber J.W., 1992. Effect of temperature, salinity and light intensity on the growth and seasonality of toxic dinoflagellates associated with ciguatera. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 157 : 79-90.
- Morton S.L., Moeller P.D.R., Young K.A., Lanoue B., 1998. Okadaic acid production from the marine dinoflagellate *Prorocentrum belizeanum* Faust isolated from the Belizean coral reef ecosystem. *Toxicon*, 36 : 201-206.
- Mosmann T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65 : 55-63.
- Moullignier A., Binet D., Frottier J., 1995. Ciguatera fish poisoning: also in Europe. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 59 : 192-199.
- Murata M., Legrand A.M., Ishibashi Y., Yasumoto T., 1989. Structures of ciguatoxin and its congener. *Journal of American Chemical Society*, 111(24) : 8929-8931.
- Murata M., Gusovsky F., Yasumoto T., Daly J.W., 1992. Selective stimulation of Ca^{2+} flux in cells by maitotoxin. *European Journal of Pharmacology : Molecular Pharmacology*, 227 : 43-49.
- Murata M., Naoki H., Iwashita T., Matsunaga S., Sasaki M., Yokoyama A., Yasumoto T., 1993. Structure of maitotoxin. *Journal of the American Chemical Society*, 115 : 2060-2062.
- Naar J. 1999. Stratégie pour le développement d'outils immunochimiques spécifiques des ciguatoxines : modélisation de la préparation de conjugués immunogènes haptène lipidique-protéine et

- production d'anticorps polyclonaux et monoclonaux dirigés contre les brévétoxines. *Thèse de Doctorat en Sciences de l'Environnement Marin* - Université Aix-Marseille II (France).
- Nakahara H., Sakami T., Chinain M., Ishida Y., 1996. The role of macroalgae in epiphytism of the toxic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* (Dinophyceae). *Phycological Research*, 44 : 113-117.
- Namikoshi M., Murakami T., Watanabe M.F., Oda T., Yamada J., Tsujimura S., Nagai H., Oishi S., 2003. Simultaneous production of homoanatoxin-a, anatoxin-a, and a new non-toxic 4-hydroxyhomoanatoxin-a by the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja. *Toxicon*, 42(5) : 533-538.
- Negri A., Lyndon L., Jason D., Nicole W., Dion F., Susan B., 2003. Paralytic Shelfish toxins are restricted to few species among Australia's taxonomic diversity of cultured microalgae. *Journal of Phycology*, 39 : 663-667.
- Negri A.P., Bunter O., Jones B., Llewellyn L., 2004. Effects of the bloom-forming alga *Trichodesmium erythraeum* on the pearl oyster *Pinctada maxima*. *Aquaculture*, 232(1-4) : 91-102.
- Nicholson B.C., and Burch M.D., 2001. Evaluation of Analytical Methods for Detection and Quantification of Cyanotoxins in Relation to Australian Drinking Water Guidelines. *National Health and Medical Research Council of Australia, the Water Services Association of Australia, and the cooperative Research Centre for Water Quality and Treatment*, 57p.
- Noguchi T. and Arakawa O., 2008. Tetrodotoxin - Distribution and accumulation in aquatic organisms, and cases of human intoxication. *Marine Drugs*, 6 : 220-242.
- Ohizumi Y., 1987. Pharmacological actions of the marine toxins ciguatoxin and maitotoxin isolated from poisonous fish. *Biological Bulletin*, 172 : 132-136.
- Ohki K., Zehr J.P., Fujita Y., 1992. *Trichodesmium* : Establishment of culture and characteristics of N₂-fixation. In Carpenter E.J., Capone D.G., Rueter J.G., editors. *Marine pelagic cyanobacteria : Trichodesmium and other diazotrophs*. NATO AS1 Series C. V. - Kluwer Academic, Dordrecht, p. 307-318.
- O'Neil J.M. and Roman M.R., 1992. Grazers and associated organisms of *Trichodesmium*. In Carpenter E.J., Capone D.G., Rueter J.G., editors. *Marine pelagic cyanobacteria : Trichodesmium and other diazotrophs*. NATO AS1 Series C. V. - Kluwer Academic, Dordrecht, p. 61-73.
- O'Neil J.M., 1998. The colonial cyanobacterium *Trichodesmium* as a physical and nutritional substrate for the harpacticoid copepod *Macrosetella gracilis*. *Journal of Plankton Research*, 20 : 43-59.
- Onuma Y., Satake M., Ukena T., Roux J., Chanteau S., Rasolofonirina N., Ratsimaloto M., Naoki H., Yasumoto T., 1999. Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxicosis. *Toxicon*, 37 : 55-65.
- Osborne N.J.T., Webb P.M., Shaw G. R., 2001. The toxins of *Lyngbya majuscula* and their human and ecological health effects. *Environment International*, 27 : 381-392.
- Palafox N.A., Jain L.G., Pinano A.Z., Gulick T.M., Williams R.K., Schatz I.J., 1988. Successful treatment of ciguatera fish poisoning with intravenous mannitol. *Journal of the American Medical Association*, 259(18) : 2740-2742.
- Parsons M.L. and Preskitt L.B., 2007. A survey of epiphytic dinoflagellates from the coastal waters of the island of Hawaii. *Harmful Algae*, 6 : 658-669.

- Pauillac S., Naar J., Branaa P., Chinain M., 1998. An improved method for the production of antibodies to lipophilic carboxylic hapten using small amount of hapten-carrier conjugate. *Journal of Immunological Methods*, 220 : 105-114.
- Pauillac S., Sasaki M., Inoue M., Naar J., Branaa P., Chinain M., Tachibana K., Legrand A.M., 2000. Characterization of mice antisera elicited with a ciguatoxin tetracyclic synthetic ring fragment (JKLM) conjugated to carrier proteins. *Toxicon*, 38 : 669-685.
- Pearn J., 2001. Neurology of ciguatera. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, 70 : 4-8.
- Perez-Arellano J.L., Lizardo O.P., Perez Brito A., Hernandez Cabrera C., Zumbado M., Carranza C., Angel-Moreno A., Dickey R.W., Boada L.D., 2005. First report of ciguatera fish poisoning in West-African coast : a public health concern in the Canary Islands (Spain). *Emerging Infectious Diseases*, 11 : 1981-1982.
- Pichon G. et Bagnis R., 1973. Recherches préliminaires sur l'éventuel pouvoir insecticide d'extraits de poissons ciguatérigènes. *Conférence technique régionale des plantes médicinales*, Papeete, Polynésie française, 13 p.
- Poli M.A., Mende T., Baden D., 1986. Brevetoxins, unique activators of voltage-sensitive sodium channels, bind to specific sites in rat brain synaptosomes. *Molecular Pharmacology*, 30 : 129-135
- Pompon A. et Bagnis R., 1984. Ciguatéra : un procédé d'extraction de la ciguatoxine. *Toxicon*, 22 : 479-482.
- Pottier I. et Vernoux J.P., 2003. Évaluation de la ciguotoxicité de poissons des Antilles par les bioessais souris et poussin. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 96 : 24-28.
- Pouria S., de Andrade A., Barbosa J., Cavalcanti R.L., Barreto V.T.S., C. Ward J., Preiser W., Poon G.K., Neild G.H., Codd G.A., 1998. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *The Lancet*, 352 : 21-26.
- Preston N.P., Burford M.A., Stenzel D.J., 1998. Effects of *Trichodesmium* spp. blooms on penaeid prawn larvae. *Marine Biology*, 131 : 671-679.
- Pringault O., de Wit R., Camoin G., 2005. Irradiance regulation of photosynthesis and respiration in modern marine microbialites built by benthic cyanobacteria in a tropical lagoon (New Caledonia). *Microbial Ecology*, 49(4) : 604-616.
- Proença L.A.O., Tamanaha M.S., Fonseca R.S., 2009. Screening the toxicity and toxin content of blooms of the cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum* (Ehrenberg) in northeast Brasil. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 15 : 204-215.
- Qiqin Y., Carmichael W., William E.R., 1997. Factors influencing growth and toxin production by cultures of the freshwater cyanobacterium *Lyngbya wollei* Farlow ex Gomont. *Journal of Applied Phycology*, 9 : 55-63.
- Quod J.P., Bourdeau P., Turquet J., Guignard A., 1994. La ciguatera dans les DOM-TOM : aspects épidémiologiques et physiologiques. *Revue de Médecine Vétérinaire et de Biologie Marine*, 141-146.
- Quod J.P. and Turquet J., 1996. Ciguatera in Réunion Island (SW Indian Ocean): Epidemiology and clinical patterns. *Toxicon*, 34 : 779-785.
- Ramos A.G., Martel A., Codd G.A., Soler E., Coca J., Redondo A., Morrison L., Metcalf F.J., Ojeda S.A., Suarez S., Petit M., 2005. Bloom of the marine diazotrophic cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum* in the northwest African Upwelling. *Marine Ecology Progress series*, 301 : 303-305.

- Randall J.E., 1958. A review of ciguatera, tropical fish poisoning, with a tentative explanation of its cause. *Bulletin of Marine Science of the Gulf and Caribbean*, 8 : 236-267.
- Randall J.E., 2005. Review of clupeotoxism, an often fatal illness from the consumption of clupeoid Fishes. *Pacific science*, 59 : 73-77.
- Rhodes L., 2010. World-wide occurrence of the toxic dinoflagellate genus *Ostreopsis* Schmidt. *Toxicon*, doi:10.1016/j.toxicon.2010.05.010.
- Richlen M.L., Morton S.L., Barber P.H., Lobel P.S., 2008. Phylogeography, morphological variation and taxonomy of the toxic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* (Dinophyceae). *Harmful Algae*, 7 : 614-629.
- Riobó P., Paz B., Franco J.M., Vázquez J.A., Murado M.A., Cacho E., 2008. Mouse bioassay for palytoxin. Specific symptoms and dose-response against dose-death time relationships. *Food and Chemical Toxicology*, 46(8) : 2639-2647.
- Robertson A., David S., Cedric R., Lyndon L., Negri A., 2004. First report of saxitoxin in octopi. *Toxicon*, 44 : 765-771.
- Rodier M. and Le Borgne R., 2008. Population dynamics and environmental conditions affecting *Trichodesmium* spp. (filamentous cyanobacteria) blooms in the south-west lagoon of New Caledonia. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 358 : 20-32.
- Rodier M. and Le Borgne R., 2010. Population and trophic dynamics of *Trichodesmium thiebautii* in the south-east lagoon of New Caledonia. Comparison with *T. erythraeum* in the south-west. *Marine Pollution Bulletin*, doi:10.1016/j.marpolbul.2010.06.018.
- Roeder K., Erler K., Kibler S., Tester P., Van The H., Nguyen-Ngoc L., Gerdts G., Luckas B., 2009. Characteristic profiles of Ciguatera toxins in different strains of *Gambierdiscus* spp. *Toxicon*, doi:10.1016/j.toxicon.2009.07.039.
- Roelfsema C.M., Phinn S.R., Dennison W.C., Dekker A.G., Brando V.E., 2006. Monitoring toxic cyanobacteria *Lyngbya majuscula* (Gomont) in Moreton Bay, Australia by integrating satellite image data and field mapping. *Harmful Algae*, 5(1) : 45-56.
- Rörig L., Yunes J.S., Kuroshima K.N., Schetinni C.A.F., Pezzuto P.R., Proena L.A.O., 1998. Studies of the ecology and toxicity of *Trichodesmium* spp. blooms in southern Brazilian coastal waters. In UNESCO IO, editor. *8th international conference of Harmful Algae*, Vigo, Spain.
- Rosewater J., 1965. The family *Tridacnidae* in the indo-pacific. *Indo-pacific mollusca*, 1(6) : 347-407.
- Satake M., 2007. Chemistry of maitotoxin. In Botana L.M., editor. *Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry*. Blackwell publishing, p.47-53.
- Sato S., Paranagua M., Eskinazi E., 1963. On the mechanism of red tide of *Trichodesmium* in Recife northeastern Brazil, with some considerations of the relation to the human disease, 'Tamandare fever'. Trabalhos do Instituto Oceanografico da Universidade Federal de Pernambuco-Recife, 5-6 : 7-49.
- Scheuer P.J., Takahashi W., Tsutsumi J., Yoshida T., 1967. Ciguatoxin : Isolation and Chemical Nature. *Science*, 155 : 1267-1268.
- Sebat C., Barguil Y., Boydron R., Barny F., Muller A., 2004. Ciguatéra : manifestations neurologiques et douleurs. *Douleurs : Evaluation - Diagnostic – Traitement*, 5(2) : 76-81.
- Sellner K.G., 1997. Physiology, ecology, and toxic properties of marine cyanobacteria blooms. *Limnology and Oceanography*, 42 : 1089-1104.

- Shears N.T., and Ross P.M., 2009. Blooms of benthic dinoflagellates of the genus *Ostreopsis*; an increasing and ecologically important phenomenon on temperate reefs in New Zealand and worldwide. *Harmful Algae*, 8 :916-925.
- Sheridan C., Steinberg D., Kling G., 2002. The microbial and metazoan community associated with colonies of *Trichodesmium* spp.: a quantitative survey. *Journal of Planktonic Research*, 24 :913-922.
- Shuval H., 2001. A preliminary estimate of the global burdent of disease associated with disease caused by wastewater pollution of the marine environment. Protecting the oceans from land based activities -*GESAMP Reports and Studies*, 71 : 41-44.
- Silvano J., 2005. Toxicité des cyanobactéries d'eau douce vis-à-vis des animaux domestiques et sauvages. *Thèse de Vétérinaire*. Université Claude-Bernard - Lyon 1, Lyon.
- Sivonen K. and Jones G. 1999. Cyanobacterial Toxins. In : Chorus I., Bartram J., editors. *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences monitoring and management*. London : E. and F.N. Spon.
- SPEHIS, 1996. Annual report for the year 1996, Reported cases of notifiable diseases for the countries and territories of the SPC region. *Secretariat of the Pacific Community*.
- Sprachta S., Camoin G., Golubic S., Le Campion T., 2001. Microbialites in a modern lagoonal environment: nature and distribution, Tikehau atoll (French Polynesia). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 175 : 103-124.
- Stewart I., Webb P., Schluter P., Shaw G., 2006. Recreational and occupational field exposure to freshwater cyanobacteria - a review of anecdotal and case reports, epidemiological studies and the challenges for epidemiologic assessment. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, 5 : 6.
- Sugg L.M. and VanDolah F.M., 1999. No evidence for an allelopathic role of okadaic acid among ciguatera-associated dinoflagellates. *Journal of Phycology*, 35 : 93-103.
- Tan C.H. and Lau C.O., 2000. Chemistry and detection. Seafood and Freshwater Toxins : Pharmacology, Physiology and Detection. *Food Science and Technology Series*, Vol. 103. In Botana L.M., Ed. Marcel Dekker Inc.
- Taniyama S., Arakawa O., Terada M., Nishio S., Takatani T., Mahmud Y., Noguchi T., 2003. *Ostreopsis* sp., a possible origin of palytoxin (PTX) in parrotfish *Scarus ovifrons*. *Toxicon*, 42 : 29-33.
- Taylor F.J.R, 1979. A description of the benthic dinoflagellate associated with maitotoxin and ciguatoxin, including observations on Hawaiian material. *Toxic Dinoflagellate Blooms*, NY. (Taylor and Seliger Eds), p. 47-56.
- Ten-Hage L., Delaunay N., Pichon V., Couté A., Puiseux-Dao S., Turquet J., 2000. Okadaic acid production from the marine benthic dinoflagellate *Prorocentrum arenarium* Faust (Dinophyceae) isolated from Europa Island coral reef ecosystem (SW Indian Ocean). *Toxicon*, 38 : 1043-1054.
- Tenório M.M.B., Le Borgne R., Rodier M., Neveux J., 2005. The impact of terrigenous inputs on the Bay of Ouiinne (New Caledonia) phytoplankton communities: A spectrofluorometric and microscopic approach. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 64(2-3) : 531-545.
- Thacker R.W. and Paul V.J., 2004. Morphological, chemical, and genetic diversity of tropical marine cyanobacteria *Lyngbya* spp. and *Symploca* spp. (Oscillatoriales). *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6) : 3305-3312.

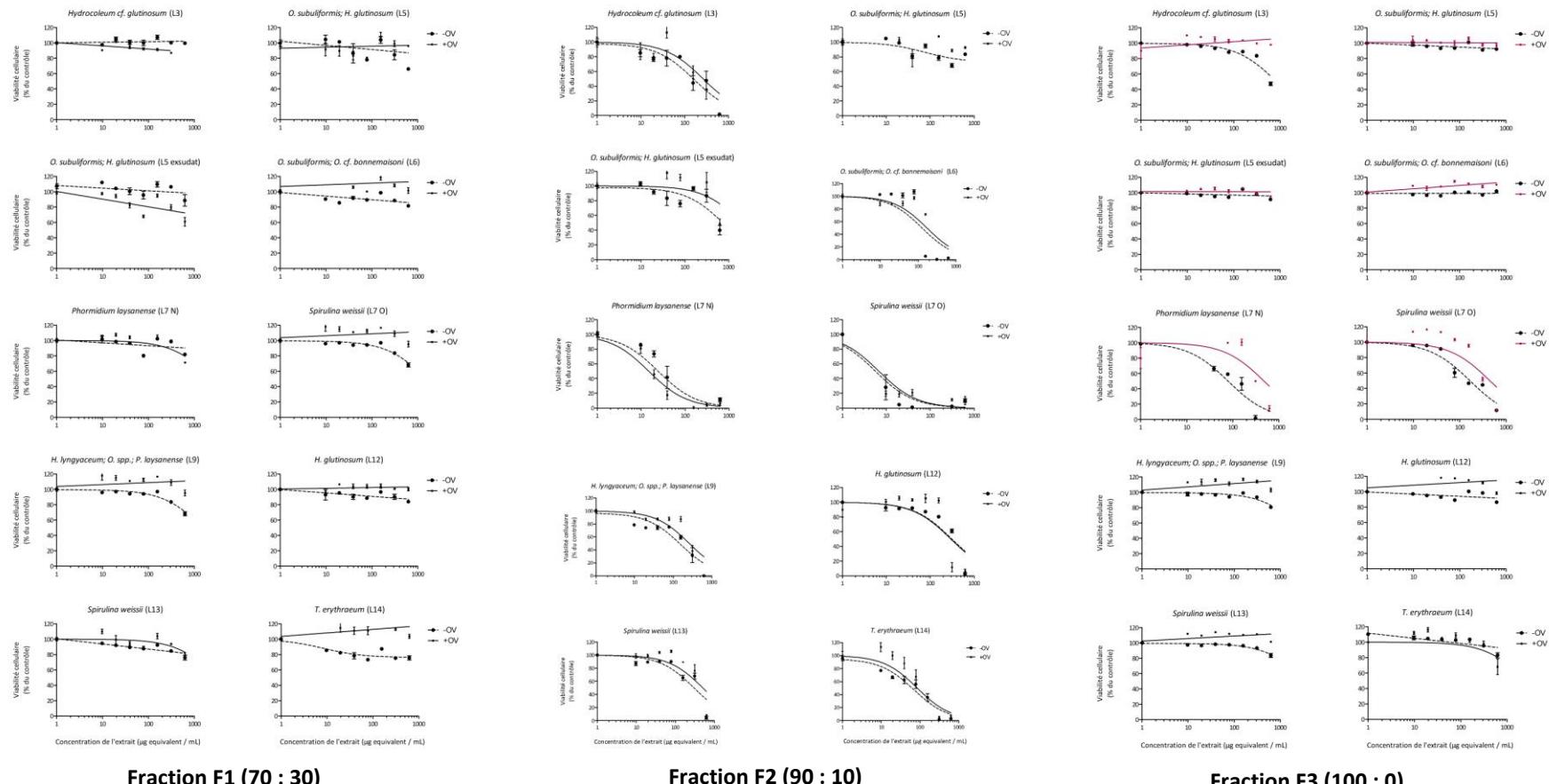
- Vaillant V., Caumes E., De Valk H., Mesnage V., Griffon A.M., 2001. Intoxication alimentaire à la ciguatera : savoir l'évoquer même en l'absence de voyage. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*, 38 : 187-193.
- Vale C. and Ares I.R., 2007. Biochemistry of palytoxins and ostreocins. In Botana L.M., editor. *Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry*. Blackwell publishing, p. 95-118.
- Van Dolah F.M., Finley E., Haynes B.L., Doucette G.J., Moeller P.D., Ramsdell J.S., 1994. Development of rapid and sensitive high throughput pharmacologic assays for marine phycotoxins. *Natural Toxins*, 2 : 189-196.
- Van Dolah F.M., 2000. Marine Algal Toxins : Origins, health effects, and their increased occurrence. *Environmental Health Perspectives*, 108 : 133-141.
- Vernoux J.P., 1994. The mouse ciguatoxin bioassay : directions for use to control fish for consumption. *Memoirs of the Queensland Museum, Brisbane*, 34(3) : 625-629.
- Vigneau J.F., Kierzek G., Dumas F., Pourriat J.L., 2008. Ciguatera : recrudescence des symptômes d'une ancienne intoxication. *Lettres à la rédaction, Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 27 : 858-864
- Villareal T.A., Hanson S., Qualia S., Jester E.L.E., Granade H.R., Dickey R. W., 2007. Petroleum production platforms as sites for the expansion of ciguatera in the northwestern Gulf of Mexico. *Harmful Algae*, 6 : 253-259.
- Watkinson A.J., O'Neil J.M., Dennison W.C., 2005. Ecophysiology of the marine cyanobacterium, *Lyngbya majuscula* (Oscillatoriaceae) in Moreton Bay. *Australia Harmful Algae*, 4(4) : 697-715
- Welker M., 2008. Cyanobacterial hepatotoxins : chemistry, biosynthesis and occurrence. In Botana L.M., editor. *Seafood and Freshwater Toxins : Pharmacology, Physiology, and Detection (Food Science and Technology)*. 2nd ed: CRC Press, p. 825-843.
- Wiegand P. and Pflugmacher S., 2005. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203(3) : 201-218.
- Withers N., 1981. Toxin production, nutrition, and distribution of *Gambierdiscus toxicus* (Hawaiian strain). In Gomez E.D., Birkeland R.W., Buddemeir R.E., Johannes J.A., Marsh Jr., Tsuda R.T. (Eds.) *Proceedings of the Fourth International Coral Reef Symposium*, Philippines, vol. 2, p. 449-451.
- Wong C.K., Hung P., Kellie L.H.L., Kai-Man K., 2005. Study of an outbreak of ciguatera fish poisoning in Hong Kong. *Toxicon*, 46 : 563-571.
- Wong C.K., Hung P., Lee K.L.H., Kai-Man K., 2006. Reply to Letter to the Editor. *Toxicon*, 48 : 470-472.
- Wood S.A., Selwood A.I., Rueckert A., Holland P.T., Milne J.R., Smith K.F., Smits B., Watts L.F., Cary C. S., 2007. First report of homoanatoxin-a and associated dog neurotoxicosis in New Zealand. *Toxicon*, 50 : 292-301.
- Wu C.H., 2009. Palytoxin: membrane mechanisms of action. *Toxicon*, 54(8) : 1183-1189.
- Yasumoto T., Bagnis R., Vernoux J.P., 1976. Toxicity of the surgeonfishes. II - Properties of the principal water-soluble toxin. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 42 : 359-365.
- Yasumoto T., Nakajima I., Bagnis R., Adachi R., 1977. Finding a dinoflagellate as a likely culprit of ciguatera. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 43 : 1021-1026.
- Yasumoto T., Nakajima I., Chungue E., Bagnis R., 1977. Toxins in the gut content of parrotfish. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 43 : 69-74.

Références bibliographiques

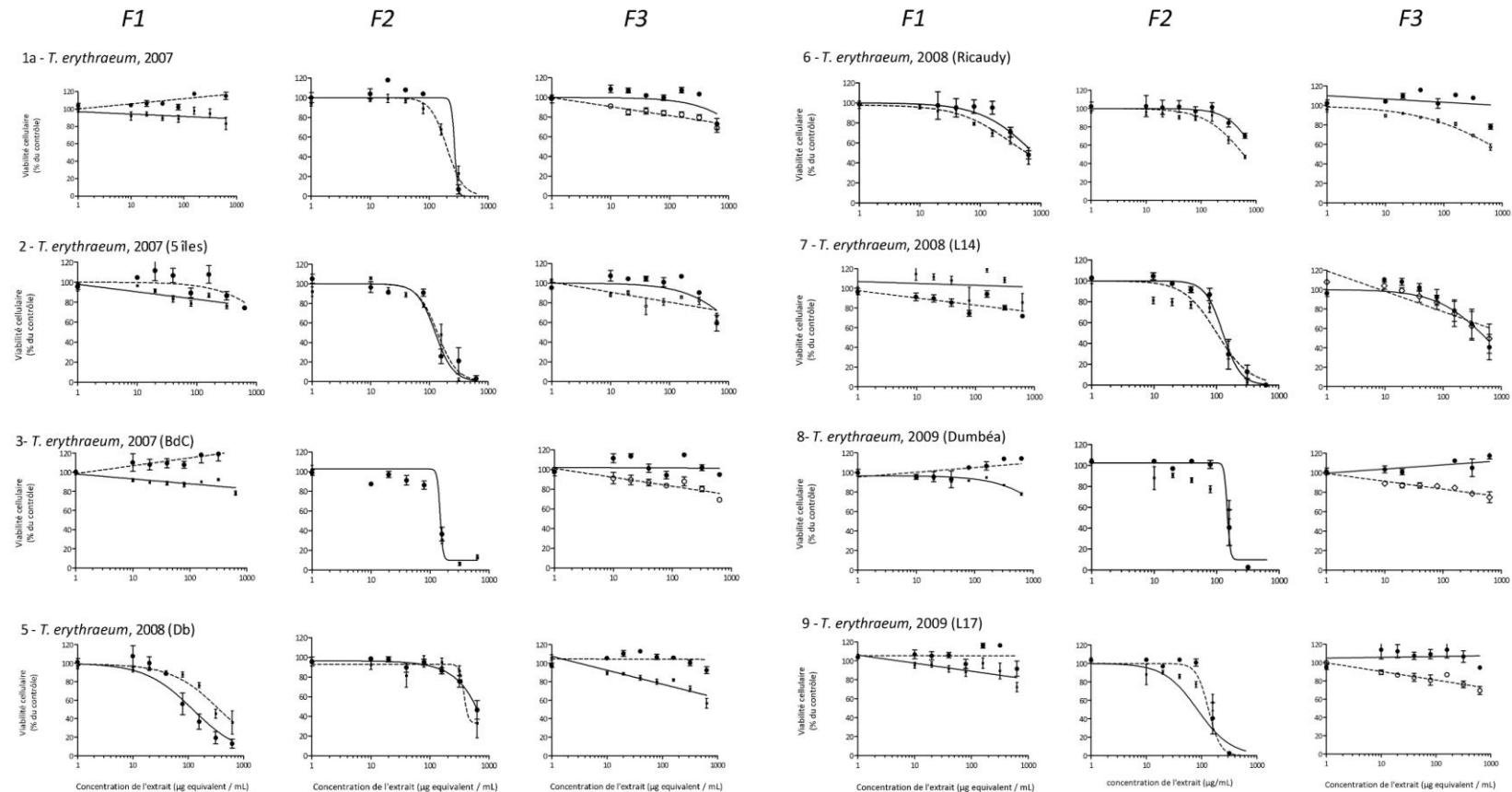
- Yasumoto T., Nakajima I., Oshima Y., Bagnis R., 1979. A new toxic dinoflagellate found in association with ciguatera. In *Toxic Dinoflagellate Blooms*, Elsevier, N.Y., Taylor and Selinger Eds, p. 65-70.
- Yasumoto T., Seina N., Muramaki Y., Murata M., 1987. Toxins produced by benthic dinoflagellates. *Biological Bulletin*, 172 : 128-131.
- Yasumoto T., 1998. Fish Poisoning due to toxins of microalgal origins in the pacific. *Toxicon*, 36 : 1515-1518.
- Yasumoto T., 2001. The chemistry and biological function of natural marine toxins. *The Chemical Record*, 1 : 228-242.
- Yasumoto T., 2005. Chemistry, etiology and food chains dynamics of marine toxins. *Proceedings of the Japan Academy*, 81 : 43-51.
- Yeeting B., 2009. Ciguatera-like fish poisoning from giant clams on Emao Island, Vanuatu. *SPC Fisheries Newsletter*, 129 : 13-16.
- Zlotnick B.A., Hintz S., Park D.L., Auerbach P.S., 1995. Ciguatera poisoning after ingestion of imported jellyfish: diagnostic application of serum immunoassay. *Wilderness et Environmental Medicine*, 6 : 288-294.

Annexes

Annexe 1 : Courbes de cytotoxicité obtenues à l'aide des fractions F1, F2 et F3 des extraits liposolubles des mattes purifiées sur sep-pak® de cyanobactéries récoltées au niveau de la ZT de Hunëtë à Lifou.



Annexe 2 : Courbes de cytotoxicité obtenues à l'aide du test N2A des fractions F1, F2 et F3 des extraits liposolubles des mattes purifiées sur sep-pak® de *Trichodesmium* (échantillons n°1 à 9).



Annexe 3 : Alignements des séquences nucléotiques de la région ITS amplifiée par PCR (460 pb) des aliquots de mattes de cyanobactéries dominées par *H. lyngbyaceum* de Lifou (avril 2005, L2) et des cyanobactéries de référence, du genre *Trichodesmium* (Z9 et IMS 101), *Oscillatoria* (PCC 7515) et *Phormidium* (OL05_phorm) (Méjean et al., 2009).

	*	20	*	40	*	60	*	80			
H_Lifou	:	AAGGGAGACCAACCGGATCA	CACAGTAAGATTAA	AAATAGTGTGT	GAAGGTCAA	ACCCCTGGTCAGCAAGGATA	AAATAAAAAGT		: 88		
T_Lifou	:	AAGGGAGACCAACCGGATCA	CACAGTAAGATTAA	AAATAGTGTGT	GAAGGTCAA	ACCCCTGGTCAGCAAGGATA	AAATAAAAAGT		: 88		
Z9	:	AAGGGAGACCAACCGGATCA	AAACAGTAAGATTAA	AAATAGTGTGT	GAAGGTCAA	ACCCCTGGTCAGCAAGGATA	AAATAAAAAGT		: 88		
IMS101	:	AAGGGAGACCAACCGGATCA	AAACAGTAAGATTAA	AAATAGTGTGT	GAAGGTCAA	ACCCCTGGTCAGCAAGGATA	AAATAAAAAGT		: 88		
PCC7515	:	AAGGGAGACCAACTGGCAC	ACGACATCCGAAAGT	AAATAGTGTGT	GAAGGTCAA	ACCCCTGGTCAGCAAGGATA	AAATAAAAAGT		: 87		
OL05_phorm	:	AAGGAGACCAACTACATT	GTTCATGCAT-----	GATGATATTGCTGAGCA	-AGT--AGGTC	AACTTAGGTCAGGTC	AGGCTTA-		: 76		
	*	100	*	120	*	140	*	160	*		
H_Lifou	:	AGTAAAGTA	AACTTCAACACTAGAGT	TAAGGTTCGA	AAATGGGCTATTAGCTCAGGTGGTAGAGCGC	ACCCCTGATAA	AGGTGAGG		: 176		
T_Lifou	:	AGTAAAGTA	AACTTCAACACTAGAGT	TAAGGTTCGA	AAATGGGCTATTAGCTCAGGTGGTAGAGCGC	ACCCCTGATAA	AGGTGAGG		: 176		
Z9	:	AGTAAAGTA	AACTTCAACACTAGAGT	TAAGGTTCGA	AAATGGGCTATTAGCTCAGGTGGTAGAGCGC	ACCCCTGATAA	AGGTGAGG		: 176		
IMS101	:	AGTAAAGTA	AACTTCAACACTAGAGT	TAAGGTTCGA	AAATGGGCTATTAGCTCAGGTGGTAGAGCGC	ACCCCTGATAA	AGGTGAGG		: 176		
PCC7515	:	---	AAAGTAACTTCAACACTAGAGG	TCTCGTTGTT	CATGGGCTATTAGCTCAGGTGGTAGAGCGC	ACCCCTGATAA	AGGTGAGG		: 172		
OL05_phorm	:	-TTAGGATGG	CTTCAAT---ATTGTCGAGTTATTA	-TGGGCTATTAGCTCAGGTGGTAGAGCGC	ACCCCTGATAA	AGGTGAGG			: 159		
	*	180	*	200	*	220	*	240	*		
H_Lifou	:	TCCCTGGTCAAGTCCAGGA	TAGGCCACCTAA	GAAGGTTAAGGGGTATAGCTCAGT	TGGTAGAGCGC	TGCCTTGCAAGGCAAGT			: 264		
T_Lifou	:	TCCCTGGTCAAGTCCAGGA	TAGGCCACCTAA	GAAGGTTAAGGGGTATAGCTCAGT	TGGTAGAGCGC	TGCCTTGCAAGGCAAGT			: 264		
Z9	:	TCCCTGGTCAAGTCCAGGA	TAGGCCACCTAA	GAAGGTTAAGGGGTATAGCTCAGT	TGGTAGAGCGC	TGCCTTGCAAGGCAAGT			: 264		
IMS101	:	TCCCTGGTCAAGTCCAGGA	TAGGCCACCTAA	GAAGGTTAAGGGGTATAGCTCAGT	TGGTAGAGCGC	TGCCTTGCAAGGCAAGT			: 264		
PCC7515	:	TCCCTGGTCAAGTCCAGGA	TAGGCCACCTAA	GAAGGTTAAGGGGTATAGCTCAGT	TGGTAGAGCGC	TGCCTTGCAAGGCAAGT			: 259		
OL05_phorm	:	TCCCTGGTCAAGTCCAGGA	TAGGCCACCTAA	GAAGGTTAAGGGGTATAGCTCAGT	TGGTAGAGCGC	TGCCTTGCAAGGCAAGT			: 239		
	*	280	*	300	*	320	*	340	*		
H_Lifou	:	CAGCGGTTCGAGTCGCTT	ACCTCCAGGA	AAAGGTTAAGGGGT			AGAAATCAGCAACA	AGACCTG		: 325	
T_Lifou	:	CAGCGGTTCGAGTCGCTT	ACCTCCAGGA	AAAGGTTAAGGGGT			AGAAATCAGCAACA	AGACCTG		: 325	
Z9	:	CAGCGGTTCGAGTCGCTT	ACCTCCAGGA	AAAGGTTAAGGGGT			AGAAATCAGCAACA	AGACCTG		: 325	
IMS101	:	CAGCGGTTCGAGTCGCTT	ACCTCCAGGA	AAAGGTTAAGGGGT			AGAAATCAGCAACA	AGACCTG		: 325	
PCC7515	:	CAGCGGTTCGAGTCGCTT	ACCTCCAGGA	AAAGGTTAAGGGGT			AGAAATCAGCAACT	AGACCTG		: 321	
OL05_phorm	:	CAGCGGTTCGAGTCGCTT	ACCTCCAGGA	AAAGGTTAAGGGGT			AGAAATCAGCAACT	AGACCTG		: 327	
	*	360	*	380	*	400	*	420	*		
H_Lifou	:	AATGAGCAAGTCATGCTGCTG	TATTCTTAA	ATACCA	GTA	--GAACCTTGAA	AAACTGCATAGTC	AAAAAA	AGTCAAA	-GTA	: 408
T_Lifou	:	AATGAGCAAGTCATGCTGCTG	TATTCTTAA	ATACCA	GTA	--GAACCTTGAA	AAACTGCATAGTC	AAAAAA	AGTCAAA	-GTA	: 408
Z9	:	AATGAGCAAGTCATGCTGCTG	TATTCTTAA	ATACCA	GTA	--GAACCTTGAA	AAACTGCATAGTC	AAAAAA	AGTCAAA	-GTA	: 408
IMS101	:	AATGAGCAAGTCATGCTGCTG	TATTCTTAA	ATACCA	GTA	--GAACCTTGAA	AAACTGCATAGTC	AAAAAA	AGTCAAA	-GTA	: 408
PCC7515	:	AATGTTCAAGTCATGCTGCTG	-GCTACTA	ATGTC	AGCCA	--GAACCTTGAA	AAACTGCATAGTC	ATCA	--GTC	AAA-GTC	: 401
OL05_phorm	:	GGTAACGAAGTAA	GAGTCGCTG	--ATTCAAGATT	CGCGATA	GAACCTTGAA	AAACTGCATAGTC	ATCA	--GTC	AAA-GTC	: 413
	*	460	*	480	*	500					
H_Lifou	:	GAACCAAGAGGTTAAGTAA	AAACCT	AAAAAA	-TCTAGTT	CAGGTGTAGAGA	AAAGAA	AAAAGT			: 467
T_Lifou	:	GAACCAAGAGGTTAAGTAA	AAACCT	AAAAAA	-TCTAGTT	CAGGTGTAGAGA	AAAGAA	AAAAGT			: 467
Z9	:	GAACCAAGAGGTTAAGTAA	AAACCT	AAAAAA	-TCTAGTT	CAGGTGTAGAGA	AAAGAA	AAAAGT			: 468
IMS101	:	GAACCAAGAGGTTAAGTAA	AAACCT	AAAAAA	-TCTAGTT	CAGGTGTAGAGA	AAAGAA	AAAAGT			: 468
PCC7515	:	CAAAAGAGGTTAGTCATA	GCT	--ACCATT	TCA	--TCAGGTG	CAGAGT				: 449
OL05_phorm	:	AAAGACAAACTA	-----	TCGCA	AAAGGATAGAGA	AGGT	-----				: 449

Annexe 4 : Récolte des micro-organismes en septembre 2007 et mai 2008 à Ouvéa.

Caractéristiques des points de prélèvements pour le suivi des micro-organismes en septembre 2007 et mai 2008 et données d'observations des dinoflagellés : données en nombre de cellules par dépôt de 20 µL de la fraction 45 – 250 µm, la présence de cyanobactéries dans la fraction est spécifiée par le surlignage de la cellule en bleu.

Date	Zone	N°	Lieu de prélèvement	Coordonnées GPS	Type de biotope	Support	Observations
Septembre 2007							
2007/08/27	SE	C01	Mouli	20°42'59.28" S 166°23'26.20"E	platier	débris coralliens + <i>Halimeda</i>	0
2007/08/27	SE	C01	Mouli	20°42'59.28" S 166°23'26.20"E	platier	<i>Halimeda</i>	0
2007/08/27	SE	C01	Mouli	20°42'59.28" S 166°23'26.20"E	platier	<i>Halimeda</i>	0
2007/08/27	SE	C02	Passe de la Calédonie (chenal Fayawa)	20°42'30.15" S 166°27'50.36"E	sableux + corail	<i>Halimeda</i>	0
2007/08/27	SE	C02	Passe de la Calédonie (platier)	20°42'30.15" S 166°27'50.36"E	platier sain	<i>Halimeda</i>	0
2007/08/27	SE	C02	Passe de la Calédonie (platier)	20°42'30.15" S 166°27'50.36"E	platier sain	<i>Chlorodesmis</i>	0
2007/08/27	NE	C02	Passe de la Calédonie (chenal)	20°42'47.86" S 166°27'46.65"E	sable	<i>Halimeda</i>	0
2007/08/27	NE	C03	Ognat	20°26'30.03" S 166°38'34.92"E	dalle sableuse	<i>Caulerpa</i> + <i>Halimeda</i>	0
2007/08/27	NE	C03	Ognat	20°26'30.03" S 166°38'34.92"E	dalle sableuse	<i>Caulerpa</i> + <i>Halimeda</i>	0
2007/08/27	NE	C04	Ognat (escalier)	20°28'31.76" S 166°38'59.69"E	sable	<i>Caulerpa</i>	0
2007/08/27	NE	C04	Ognat (escalier)	20°28'31.76" S 166°38'59.69"E	sable	<i>Caulerpa</i>	0
2007/08/27	NE	C05	Ognat (rampe)	20°28'01.26" S 166°38'33.13"E	sable	<i>Caulerpa</i>	0
2007/08/28	LA	C06	Hanawa	20°31'19.11" S 166°34'32.81"E	Platier	<i>Halimeda</i>	0

2007/08/28	SE	C07	Passe de Lifou (platier)	20°42'28.77" S 166°28'54.39"E	dalle corallienne	Coralines, <i>Halimeda</i> ,	0
2007/08/28	SE	C08	Passe de Lifou (sous voûte)	20°42'25.21" S 166°28'44.45"E	sable	<i>Halimeda</i>	0
2007/08/28	SE	C10	Gece	20°41'09.93" S 166°22'21.15"E	sable	<i>Halimeda</i>	0
2007/08/28	SE	C11	Gee	20°40'08.37" S 166°22'09.21"E	sable	<i>Halimeda</i>	0
2007/08/29	NW	C12	Angeu	20°27'07.95" S 166°24'01.20"E	sable	<i>Halimeda</i>	0
2007/08/29	NW	C12	Angeu	20°27'07.95" S 166°24'01.20"E	dalle sableuse	<i>Halimeda</i>	0
2007/08/29	NW	C13	Wenvöök (est)	20°26'41.25" S 166°27'44.53"E	sable-débris coralliens	débris coralliens	0
2007/08/29	NW	C14	Wenvöök (ouest)	20°26'16.88" S 166°28'34.70"E	sable	<i>Halimeda</i>	0
2007/08/29	LA	C15	Digue Lekiny-Fayaoué	20°41'16.89" S 166°29'34.35"E	sable	-	0
2007/08/29	LA	C16	plage avant Wadrilla	20°36'12.05" S 166°33'27.71"E	dalle corallienne	Rhodophycées réticulées+ <i>Acanthophora</i>	< 10
2007/08/29	LA	C17	Wharf (droite)	20°32'58.19" S 166°33'48.96"E	sable	Rhodophycées (<i>Digenea simplex</i>)	< 10
2007/08/29	LA	C18	Wharf (gauche)	20°32'59.30" S 166°33'48.84"E	sable	Rhodophycées (<i>Digenea simplex</i>)	< 10
2007/08/29	LA	C19	Hanawa (rampe de mise à l'eau)	20°31'18.50" S 166°34'16.83"E	dalle corallienne	Phéophycées (dont sargasses)	0
2007/08/29	LA	C20	Col du casse-cou côté sud-est	20°30'23.80" S 166°34'40.31"E	sable	Phéophycées + <i>Halimeda</i>	0
2007/08/29	LA	C21	Takidji	20°28'37.78" S 166°35'36.65"E	dalle corallienne	Phéophycées	< 10
2007/08/29	LA	C22	Col du casse-cou côté sud-ouest	20°32'58.63" S 166°34'15.89"E	dalle corallienne	Phéophycées	0
2007/08/29	LA	C23	Face gîte	20°37'20.37" S 166°33'05.54"E	sable	herbiers+ phéophycées + Rhodophycées	0

2007/08/30	LA	C24	Milieu lagon	20°42'180" S 166°24'970"E	sable	<i>Halimeda</i>	0
2007/08/30	LA	C25	Milieu lagon, plateau	20°42'180" S 166°24'970"E	sable	débris coralliens et coquilliers <i>Halimeda</i> + Chorophycées filamenteuse	0
2007/08/30	LA	C26	"ancrage"	20°42'180" S 166°24'970"E	dalle sableuse	Chorophycées filamenteuse	0
2007/08/30	LA	C27	Wadrilla wharf	20°32'42.07" S 166°33'53.77"E	dalle sableuse	Rhodophycées (<i>Digenea simplex</i>)	0
2007/08/30	LA	C28	Wadrilla wharf	20°32'50.64" S 166°33'53.29"E	dalle sableuse	Rhodophycées (<i>Digenea simplex</i>)	< 10
2007/08/30	LA	C29	Wadrilla wharf	20°32'58.19" S 166°33'48.96"E	dalle sableuse	Rhodophycées (<i>Digenea simplex</i>)	< 10
2007/08/30	LA	C30	Wadrilla wharf	20°32'59.30" S 166°33'48.84"E	dalle sableuse	Rhodophycées (<i>Digenea simplex</i>)	< 10
2007/08/30	LA	C31	Wadrilla wharf	20°33'02.30" S 166°33'47.50"E	dalle sableuse	Rhodophycées (<i>Digenea simplex</i>)	0
2007/08/30	LA	C32	Wadrilla wharf	20°34'47.33" S 166°33'38.31"E	dalle sableuse	Rhodophycées (<i>Digenea simplex</i>)	< 10
Mai 2008							
2008/05/26	SE	C01	Mouli	20°42'59.28" S 166°23'26.20"E	dalle sableuse corallienne	<i>Halimeda</i>	0
2008/05/26	SE	C01	Mouli	20°42'59.28" S 166°23'26.20"E	dalle sableuse corallienne	<i>Halimeda</i> + débris coralliens	0
2008/05/26	SE	C01	Mouli	20°42'59.28" S 166°23'26.20"E	zone sableuse	<i>Halimeda</i>	0
2008/05/27	SE	C02	Chenal de Fayawa	20°42'30.15" S 166°27'50.36"E		débris coralliens	0
2008/05/27	NE	C03	Ognat	20°26'30.03" S 166°38'34.92"E	dalle sableuse	Rhodophycées	0
2008/05/27	NE	C04	Ognat (escalier)	20°28'31.76" S 166°38'59.69"E	sable	<i>Halimeda</i> - Rhodophycées	0
2008/05/27	NE	C05	Ognat (rampe)	20°28'01.26" S 166°38'33.13"E	sable	<i>Halimeda</i> - Rhodophycées	0

2008/05/26	LA	C06	Col casse-cou coté est-Hanawa	20°31'19.11" S 166°34'32.81"E	platier cuvette	<i>Caulerpa-Halimeda-</i>	0
2008/05/26	SE	C08	Lekiny	20°42'25.21" S 166°28'44.45"E	sable	<i>Halimeda</i>	0
2008/05/27	SE	C10	Gece	20°41'09.93" S 166°22'21.15"E	sable	débris coralliens	0
2008/05/27	SE	C11	Gee	20°40'08.37" S 166°22'09.21"E	sable	débris coralliens	0
2008/05/28	NW	C12	Angeu	20°27'07.95" S 166°24'01.20"E	sable	<i>Halimeda sur sable</i>	0
2008/05/30	NW	C13	Wenvöök Est	20°26'41.25" S 166°27'44.53"E	sable	<i>Halimeda sur sable</i>	0
2008/05/29	NW	C14	Wenvöök Ouest	20°26'16.88" S 166°28'34.70"E	sable	débris coralliens	0
2008/05/27	LA	C16	Ognat (escalier)	20°36'12.05" S 166°33'27.71"E	sable	<i>Caulerpa</i>	0
2008/05/26	LA	C19	Hanawa (rampe de mise à l'eau)	20°31'18.50" S 166°34'16.83"E	dalle corallienne	Phéophycées	0
2008/05/27	LA	C20	Plage	20°30'23.80" S 166°34'40.31"E	sable	Rhodophycées	0
2008/05/27	LA	C21	Héo -Takiji	20°28'37.78" S 166°35'36.65"E	dalle sableuse	Rhodophycées	0
2008/05/26	LA	C22	Col du casse-cou coté sud ouest	20°32'58.63" S 166°34'15.89"E	dalle corallienne	Rhodophycées (<i>Digenea simplex</i>)	0
2008/05/26	LA	C30	Wadrilla wharf (Sud, au pied)	20°32'59.30" S 166°33'48.84"E	dalle sableuse	Rhodophycées (<i>Digenea simplex</i>)	0
2008/05/26	LA	C31	Wadrilla wharf (Nord, au pied)	20°33'02.30" S 166°33'47.50"E	dalle sableuse	Rhodophycées (<i>Digenea simplex</i>)	0
2008/05/26	LA	C32	Wadrilla wharf (Nord, 100m du pied)	20°34'47.33" S 166°33'38.31"E	dalle sableuse	Rhodophycées (<i>Digenea simplex</i>)	0
2008/05/27	LA	C33	Wadrilla wharf (Nord)	20°34'47.33" S 166°33'38.31"E	sable	Rhodophycées (<i>Digenea simplex</i>)	0

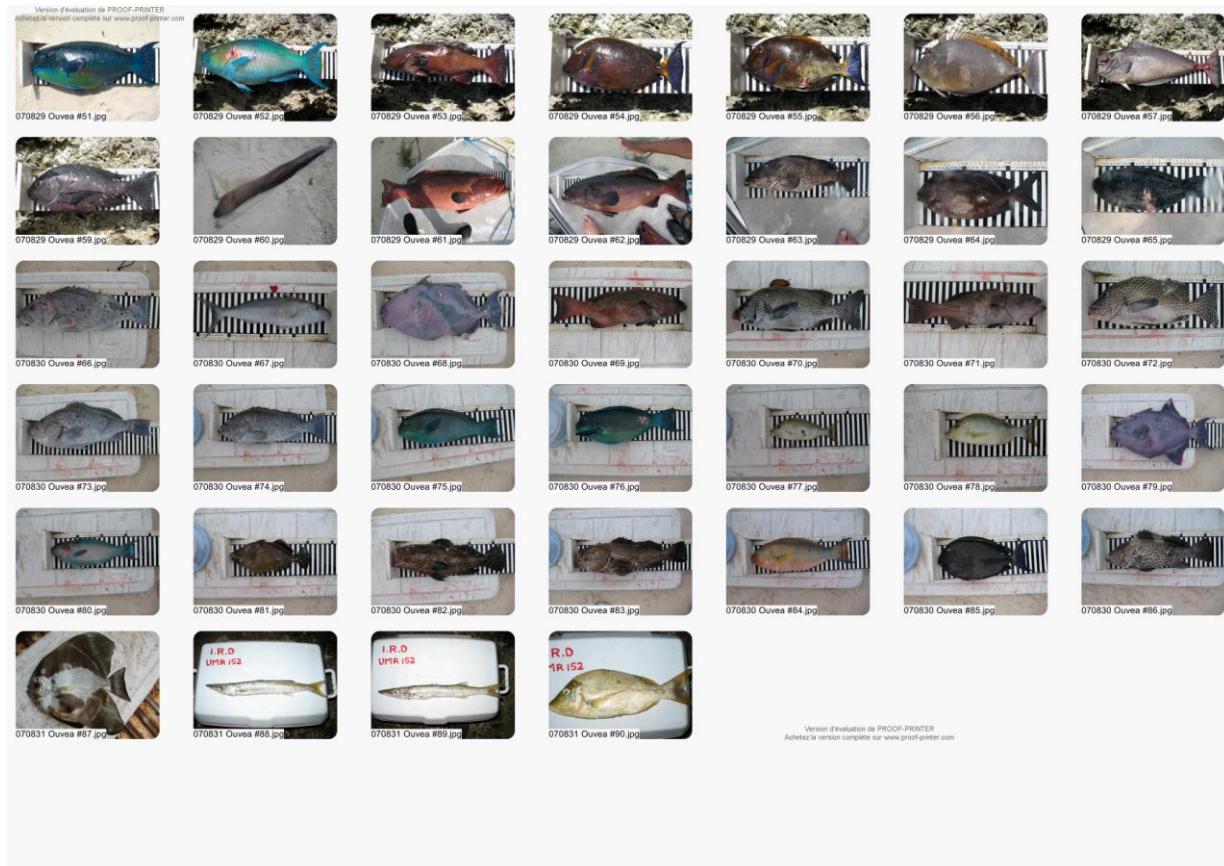
Annexe 5 : Récolte des poissons de septembre 2007 à Ouvéa et données de toxicité.

Récolte de poissons à Ouvéa : référence, lieu de pêche, identification, régime alimentaire et caractéristiques biométriques et résultats de toxicité donnés par classe (Atox, Tox+ et Tox++).

N°	SITE	ZONE	Lieu dit	Espèce	Nom	Régime alimentaire	LF (cm)	Poids (g)	Toxicité
1	NE	Z01	Houlikeous	<i>Siganus punctatus</i>	Picot	herbivore	32	1000	Tox++
2	NE	Z01	Houlikeous	<i>Trachinotus blochii</i>	Carangue	carnivore	46	2800	ATox
3	NE	Z01	Houlikeous	<i>Plectropomus laevis</i>	Saumonée	carnivore	65	ND	ATox
4	NE	Z02	Ognat	<i>Epinephelus cf.. maculatus</i>	Loche	carnivore	36	650	ATox
5	NE	Z02	Ognat	<i>Cephalopholis argus</i>	Loche	carnivore	39	1100	ATox
6	NE	Z02	Ognat	<i>Siganus punctatus</i>	Picot	herbivore	35	1100	ATox
7	NE	Z02	Ognat	<i>Siganus cf.. vermiculatus</i>	Picot	herbivore	35	900	ATox
8	NE	Z02	Ognat	<i>Cetoscarus bicolore</i>	Perroquet	herbivore	45	1880	ATox
9	NE	Z02	Ognat	<i>Chlorurus microrhinos</i>	Perroquet	herbivore	38	1240	ATox
10	NE	Z02	Ognat	<i>Monotaxis grandoculis</i>	Bossu	invertébrés	39	1440	ATox
11	NE	Z02	Ognat	<i>Gnathodentex aureolineatus</i>	Bossu	invertébrés	28	500	ATox
12	SE	Z03	Mouli	<i>Lutjanus bohar</i>	Anglais	carnivore	53	3000	ATox
13	SE	Z03	Mouli	<i>Clorurus microrhinos</i>	Perroquet	herbivore	43	1540	ATox
14	NE	Z04	Hoony	<i>Chlorurus microrhinos</i>	Perroquet	herbivore	48	2350	ATox
15	NE	Z04	Hoony	<i>Scarus altipinnis</i>	Perroquet	herbivore	47	1900	Tox++
16	NE	Z04	Hoony	<i>Chlorurus microrhinos</i>	Perroquet	herbivore	45	2000	ATox
17	NE	Z04	Hoony	<i>Scarus altipinnis</i>	Perroquet	herbivore	48	2000	Tox++
18	NE	Z04	Hoony	<i>Chlorurus microrhinos</i>	Perroquet	herbivore	41	1500	ATox
19	NE	Z04	Hoony	<i>Siganus punctatus</i>	Picot	herbivore	38	1500	ATox
20	NE	Z04	Hoony	<i>Siganus punctatus</i>	Picot	herbivore	33	1100	Tox++
21	NE	Z04	Hoony	<i>Siganus cf.. vermiculatus</i>	Picot	herbivore	37	1100	ATox
22	NE	Z04	Hoony	<i>Siganus spinus</i>	Picot	herbivore	19	100	Tox++
23	NE	Z04	Hoony	<i>Kyphosus sp.</i>	Wiwa	omnivore	37	1150	ATox
24	NE	Z04	Hoony	<i>Plectropomus laevis</i>	Saumonée	carnivore	48	1530	ATox
25	SE	Z03	Mouli	<i>Plectropomus laevis</i>	Saumonée	carnivore	65	5620	Tox++
26	SE	Z03	Mouli	<i>Epinephelus polyphekadion</i>	Loche	carnivore	51	2200	Tox++
27	SE	Z03	Mouli	<i>Epinephelus cf.. maculatus</i>	Loche	carnivore	43	2000	ATox
28	SW	Z05	Pléiade Sud	<i>Epinephelus sp.</i>	Loche	carnivore	48	1850	Tox+
29	SW	Z05	Pléiade Sud	<i>Epinephelus maculatus</i>	Loche	carnivore	48	1440	ATox
30	SW	Z05	Pléiade Sud	<i>Lutjanus bohar</i>	Anglais	carnivore	57	3680	Tox++
31	SW	Z05	Pléiade Sud	<i>Scarus altipinnis</i>	Perroquet	herbivore	41	1650	ATox
32	SW	Z08	Ile de Sou	<i>Plectrorthincus lineatus</i>	Castex	invertébrés	66	3620	ATox
33	SW	Z08	Ile de Sou	<i>Variola louti</i>	Loche	carnivore	51	2200	ATox
34	SW	Z08	Ile de Sou	<i>Carangoides ferdau</i>	Carangue	omnivore	49	2500	ATox
35	SW	Z08	Ile de Sou	<i>Naso tonganus</i>	Nason	herbivore	50	1800	ATox
36	SW	Z08	Ile de Sou	<i>Macolor niger</i>	Vivaneau	zooplanctonophage	46	1800	ATox
37	SW	Z08	Ile de Sou	<i>Carangoides orthogrammus</i>	Carangue	omnivore	35	800	ATox
38	SW	Z08	Ile de Sou	<i>Lethrinus rubrioperculatus</i>	Bossu	invertébrés	39	1000	ATox
39	SW	Z08	Ile de Sou	<i>Lethrinus rubrioperculatus</i>	Bossu	invertébrés	33	650	ATox
40	SW	Z08	Ile de Sou	<i>Acanthurus blochii</i>	Chirurgien	herbivore	38	1600	ATox
41	SW	Z08	Ile de Sou	<i>Acanthurus dussumieri</i>	Chirurgien	herbivore	40	1400	ATox

N°	SITE	ZONE	Lieu dit	Espèce	Nom	Régime alimentaire	LF (cm)	Poids (g)	Toxicité
42	SW	Z08	Ile de Sou	<i>Acanthurus dussumieri</i>	Chirurgien	herbivore	36	1000	ATox
43	SW	Z08	Ile de Sou	<i>Acanthurus dussumieri</i>	Chirurgien	herbivore	42	1900	ATox
44	SW	Z08	Ile de Sou	<i>Scarus ghobban</i>	Perroquet	herbivore	54	2900	ATox
45	SW	Z08	Ile de Sou	<i>Scarus ghobban</i>	Perroquet	herbivore	47	2100	ATox
46	SW	Z08	Ile de Sou	<i>Epinephelus polyphekadion</i>	Loche	carnivore	54	3050	ATox
47	SW	Z08	Ile de Sou	<i>Epinephelus polyphekadion</i>	Loche	carnivore	54	2740	ATox
48	SW	Z08	Ile de Sou	<i>Plectropomus leopardus</i>	Saumonée	carnivore	65	4320	Tox++
49	SW	Z08	Ile de Sou	<i>Plectrorhincus lineatus</i>	Castex	invertébrés	43	1330	ATox
50	SW	Z08	Ile de Sou	<i>Plectropomus leopardus</i>	Saumonée	carnivore	70	6000	ATox
51	NW	Z06	Ilot de la Table	<i>Chlorurus microrhinos</i>	Perroquet	herbivore	44	1920	ATox
52	NW	Z06	Ilot de la Table	<i>Chlorurus microrhinos</i>	Perroquet	herbivore	55	4000	ATox
53	NW	Z06	Ilot de la Table	<i>Plectropomus laevis</i>	Saumonée	carnivore	47	1600	ATox
54	NW	Z06	Ilot de la Table	<i>Acanthurus dussumieri</i>	Chirurgien	herbivore	32	860	ATox
55	NW	Z06	Ilot de la Table	<i>Acanthurus dussumieri</i>	Chirurgien	herbivore	33	780	Tox++
56	NW	Z06	Ilot de la Table	<i>Naso unicornis</i>	Dawa	herbivore	37	940	Tox++
57	NW	Z06	Ilot de la Table	<i>Naso tonganus</i>	Nason	herbivore	54	2040	Tox++
58	NW	Z06	Ilot de la Table	<i>Plectrorhincus chaetodonoides</i>	Castex	invertébrés	47	1880	ATox
59	NW	Z06	Ilot de la Table	<i>Macolor niger</i>	Vivaneau	zooplanctonophage	43	1740	ATox
60	NW	Z07	Wenvook	<i>Gymnothorax javanicus</i>	Murène	carnivore	170		Tox++
61	NW	Z07	Wenvook	<i>Plectropomus laevis</i>	Saumonée	carnivore	100	15000	ATox
62	NW	Z07	Wenvook	<i>Plectropomus laevis</i>	Saumonée	carnivore	85	10000	ATox
63	NW	Z07	Wenvook	<i>Epinephelus maculatus</i>	Loche	carnivore	39	1140	ATox
64	NW	Z07	Wenvook	<i>Siganus punctatus</i>	Picot	herbivore	25	340	ATox
65	NW	Z07	Wenvook	<i>Scarus niger</i>	Perroquet	herbivore	30	660	ATox
66	LA	Z09	milieu lagon	<i>Epinephelus cyanopodus</i>	Loche	carnivore	50	2000	ATox
67	LA	Z10	milieu lagon	<i>Aprion virescens</i>	Mékoua	carnivore	37	780	ATox
68	LA	Z10	milieu lagon	<i>Pseudobalistes fuscus</i>	Baliste	invertébrés	50	2700	ATox
69	LA	Z11	milieu lagon	<i>Plectropomus laevis</i>	Saumonée	carnivore	44	1300	ATox
70	LA	Z11	milieu lagon	<i>Plectrorhincus chaetodonoides</i>	Castex	invertébrés	43	1530	ATox
71	LA	Z11	milieu lagon	<i>Plectropomus laevis</i>	Saumonée	carnivore	36	720	ATox
72	LA	Z11	milieu lagon	<i>Plectrorhincus chaetodonoides</i>	Castex	invertébrés	34	820	ATox
73	LA	Z11	milieu lagon	<i>Epinephelus cyanopodus</i>	Loche	carnivore	54	2500	ATox
74	LA	Z11	milieu lagon	<i>Epinephelus cyanopodus</i>	Loche	carnivore	48	1700	ATox
75	LA	Z11	milieu lagon	<i>Chlorurus microrhinos</i>	Perroquet	herbivore	38	1320	ATox
76	LA	Z11	milieu lagon	<i>Chlorurus microrhinos</i>	Perroquet	herbivore	41	1700	ATox
77	LA	Z11	milieu lagon	<i>Lethrinus nebulosus</i>	Bec	invertébrés	25	200	ATox
78	LA	Z11	milieu lagon	<i>Lethrinus nebulosus</i>	Bec	invertébrés	30	520	ATox
79	LA	Z11	milieu lagon	<i>Pseudobalistes fuscus</i>	Baliste	invertébrés	48	4000	ATox
80	LA	Z11	milieu lagon	<i>Scarus oviceps</i>	Perroquet	herbivore	34	800	ATox
81	LA	Z12	ancrage	<i>Sufflamen sp</i>	Baliste	invertébrés	31	700	ATox
82	LA	Z12	ancrage	<i>Epinephelus maculatus</i>	Loche	carnivore	45	1250	ATox
83	LA	Z12	ancrage	<i>Epinephelus maculatus</i>	Loche	carnivore	52	1820	ATox
84	LA	Z13	ancrage	<i>Scarus ghobban</i>	Perroquet	herbivore	42	1460	ATox
85	LA	Z13	ancrage	<i>Acanthurus blochii</i>	Chirurgien	herbivore	33	1040	ATox
86	LA	Z13	ancrage	<i>Epinephelus maculatus</i>	Loche	carnivore	44	1100	ATox
87	LA	Z14	wharf	<i>Platax sp.</i>	Platax	omnivore	33	1340	ATox
88	LA	Z14	wharf	<i>Sphyraena flavicauda</i>	Bécune	carnivore	40	370	ATox

89	LA	Z14	wharf	<i>Sphyraena flavicauda</i>	Bécune	carnivore	40	350	ATox
90	LA	Z14	wharf	<i>Lethrinus nebulosus</i>	Bec	invertébrés	43	1160	ATox
Version d'évaluation de PROOF-PRINTER Achetez la version complète sur www.proof-printer.com									



Annexe 6 : Paramètres du suivi biosystémique mené en 2008 et 2009 par Vale dans le cadre de son suivi environnemental.

Zone	Station	N°	Coordonnées (RGNC 91)	
Baie de prony	Ilot Casy	1	166°51,033	22°21,799
	Creek Baie Nord	2	166°52,546	22°20,356
	Port	3	166°53,639	22°21,312
Canal de la Havannah	Récif Pointe Puka	8	166°58,554	

Classe d'abondance	Recouvrement	Abondance
1	Rare	< 0,5% (soit <0,5 m ² /100 m ²)
2	Faible	0,5% à 5% (soit 0,5 à 5 m ² /100 m ²)
3	Moyen	5% à 10% (soit 5 à 10 m ² /100 m ²)
4	Fort	10% à 15% (soit 10 à 15 m ² /100m ²)
5	Important	> 15% (soit > 15 m ² /100m ²)

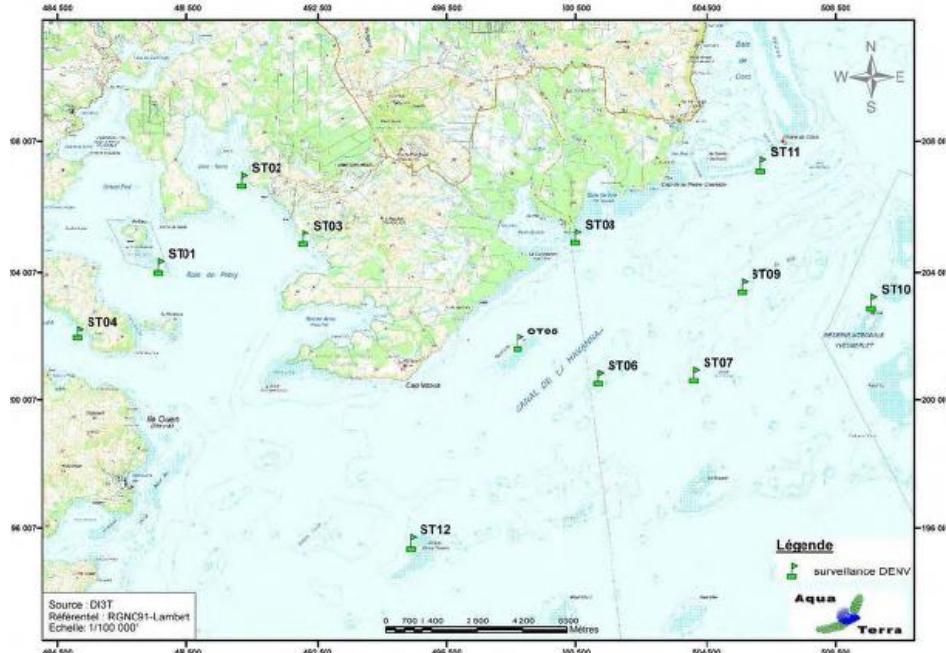


Figure 75 : Localisation des stations du suivi mené par Vale (données Vale).

Annexe 7 : Récolte des poissons d'avril 2008 et 2009 à Prony et données de toxicité.

Poissons collectés en 2008 et 2009 au Port de Prony (1), à Bonne Anse (2) et à Port Boisé (3): caractéristiques de chaque spécimen (Identification, données biométriques) et classe de toxicité évaluée par le test N2A.

Zone	Réf	Famille	Espèce	Nom	Régime alimentaire	Masse g	Taille cm	Toxicité
2008								
1	P04	Serranidae	<i>Plectropomus leopardus</i>	Saumonée	Carnivore	820	36	Atox
1	P05	Serranidae	<i>Plectropomus leopardus</i>	Saumonée	Carnivore	500	31	Atox
1	P06	Serranidae	<i>Plectropomus leopardus</i>	Saumonée	Carnivore	500	32	Atox
1	P07	Serranidae	<i>Plectropomus leopardus</i>	Saumonée	Carnivore	1 270	45	Atox
1	P08	Serranidae	<i>Plectropomus leopardus</i>	Saumonée	Carnivore	1 540	47	Atox
1	P53	Lethrinidae	<i>Lethrinus harak</i>	Bossu	IB	300	24	Tox+
1	P58	Lethrinidae	<i>Lethrinus harak</i>	Bossu	IB	260	23	Atox
1	P45	Scaridae	<i>Scarus rivulatus</i>	Perroquet	Herbivore	550	29	Atox
1	P48	Scaridae	<i>Scarus rivulatus</i>	Perroquet	Herbivore	300	23	Atox
1	P59	Scaridae	<i>Scarus rivulatus</i>	Perroquet	Herbivore	560	29	Atox
1	P51	Labridae	<i>Choerodon graphicus</i>	Perroquet wallis	Molluscivore	700	30	Tox+
1	P46	Serranidae	<i>Plectropomus leopardus</i>	Saumonée	Carnivore	580	33	Atox
1	P47	Serranidae	<i>Plectropomus leopardus</i>	Saumonée	Carnivore	800	38	Atox
1	P50	Serranidae	<i>Plectropomus leopardus</i>	Saumonée	Carnivore	340	27	Atox
1	P52	Serranidae	<i>Plectropomus leopardus</i>	Saumonée	Carnivore	340	28	Tox++
1	P55	Serranidae	<i>Plectropomus leopardus</i>	Saumonée	Carnivore	600	33	Tox+
1	P54	Kyphosidae	<i>Kyphosus sydneyanus</i>	Ui-Ua	Omnivore	660	29	Atox
1	P56	Kyphosidae	<i>Kyphosus sydneyanus</i>	Ui-Ua	Omnivore	900	32	Tox+
1	P57	Kyphosidae	<i>Kyphosus sydneyanus</i>	Ui-Ua	Omnivore	700	31	Tox+
2	P30	Acanthuridae	<i>Naso unicornis</i>	Dawa	Herbivore	900	35	Atox
2	P32	Scaridae	<i>Chlorurus microrhinos</i>	Perroquet	Herbivore	1 660	43	Atox
2	P28	Serranidae	<i>Plectropomus leopardus</i>	Saumonée	Carnivore	1 650	47	Atox
2	P29	Serranidae	<i>Plectropomus leopardus</i>	Saumonée	Carnivore	1 060	42	Tox+
2	P31	Serranidae	<i>Plectropomus leopardus</i>	Saumonée	Carnivore	1 100	43	Tox+
2	P38	Acanthuridae	<i>Naso unicornis</i>	Dawa	Herbivore	980	36	Atox
2	P42	Acanthuridae	<i>Naso unicornis</i>	Dawa	Herbivore	1 700	43	Atox
2	P43	Acanthuridae	<i>Naso unicornis</i>	Dawa	Herbivore	1 500	42	Atox
2	P44	Acanthuridae	<i>Naso unicornis</i>	Dawa	Herbivore	1 800	42	Atox
2	P35	Scaridae	<i>Chlorurus microrhinos</i>	Perroquet	Herbivore	1 200	38	Atox
2	P39	Scaridae	<i>Scarus altipinnis</i>	Perroquet	Herbivore	1 300	39	Atox
2	P40	Scaridae	<i>Chlorurus microrhinos</i>	Perroquet	Herbivore	900	34	Atox
2	P36	Labridae	<i>Choerodon graphicus</i>	Perroquet wallis	Molluscivore	600	30	Tox++
2	P41	Labridae	<i>Choerodon graphicus</i>	Perroquet wallis	Molluscivore	900	34	Atox
2	P33	Serranidae	<i>Plectropomus leopardus</i>	Saumonée	Carnivore	1 400	41	Atox
2	P34	Serranidae	<i>Plectropomus leopardus</i>	Saumonée	Carnivore	1 000	40	
3	P12	Acanthuridae	<i>Acanthurus xanthopterus</i>	Chirurgien	Herbivore	1 300	39	Atox

3	P14	Acanthuridae	<i>Naso unicornis</i>	Dawa	Herbivore	2 400	48	Atox
3	P17	Acanthuridae	<i>Naso unicornis</i>	Dawa	Herbivore	2 100	47	Atox
3	P18	Acanthuridae	<i>Naso unicornis</i>	Dawa	Herbivore	2 000	43	Atox
3	P20	Acanthuridae	<i>Naso unicornis</i>	Dawa	Herbivore	1 800	45	Atox
3	P16	Scaridae	<i>Chlorurus microrhinos</i>	Perroquet	Herbivore	1 200	38	Atox
3	P19	Scaridae	<i>Chlorurus microrhinos</i>	Perroquet	Herbivore	1 100	37	Atox
3	P21	Scaridae	<i>Chlorurus microrhinos</i>	Perroquet	Herbivore	1 000	34	Atox
3	P22	Scaridae	<i>Scarus altipinnis</i>	Perroquet	Herbivore	500	31	Atox
3	P24	Labridae	<i>Choerodon graphicus</i>	Perroquet wallis	Molluscivore	1 100	36	Atox
3	P26	Labridae	<i>Choerodon graphicus</i>	Perroquet wallis	Molluscivore	600	30	Tox+
3	P27	Labridae	<i>Choerodon graphicus</i>	Perroquet wallis	Molluscivore	1 400	40	Atox
3	P09	Serranidae	<i>Plectropomus laevis</i>	Saumonée	Carnivore	2 900	57	Atox
3	P23	Serranidae	<i>Plectropomus laevis</i>	Saumonée	Carnivore	1 800	49	
3	P25	Serranidae	<i>Plectropomus laevis</i>	Saumonée	Carnivore	1 300	45	Tox+
3	P13	Serranidae	<i>Plectropomus leopardus</i>	Saumonée	Carnivore	2 300	54	Atox
3	P15	Serranidae	<i>Plectropomus leopardus</i>	Saumonée	Carnivore	1 200	42	Atox
4	P03	Serranidae	<i>Plectropomus leopardus</i>	Saumonée	Carnivore	500	32	Atox
4	P01	Scombridae	<i>Scomberomorus commerson</i>	Thazard du lagon	Carnivore	2 980	75	Atox
4	P02	Scombridae	<i>Scomberomorus commerson</i>	Thazard du lagon	Carnivore	4 000	80	Atox
2009								
1	P35	Scaridae	<i>Scarus rivulatus</i>	Perroquet	Herbivore	500	26	Atox
1	P38	Scaridae	<i>Scarus rivulatus</i>	Perroquet	Herbivore	600	30	Atox
1	P40	Scaridae	<i>Scarus rivulatus</i>	Perroquet	Herbivore	560	26	Atox
1	P41	Scaridae	<i>Scarus rivulatus</i>	Perroquet	Herbivore	410	25	Atox
1	P42	Scaridae	<i>Scarus rivulatus</i>	Perroquet	Herbivore	750	30	Atox
1	P36	Labridae	<i>Choerodon graphicus</i>	Perroquet wallis	Molluscivore	1000	33	Tox++
1	P32	Serranidae	<i>Plectropomus leopardus</i>	Saumonée	Carnivore	1400	44	Atox
1	P33	Serranidae	<i>Plectropomus leopardus</i>	Saumonée	Carnivore	300	26	Atox
1	P34	Serranidae	<i>Plectropomus leopardus</i>	Saumonée	Carnivore	1600	43	Atox
1	P37	Serranidae	<i>Plectropomus leopardus</i>	Saumonée	Carnivore	700	35	Tox+
1	P39	Serranidae	<i>Plectropomus leopardus</i>	Saumonée	Carnivore	950	37	Atox
1	P46	Labridae	<i>Cheilinus chlorourus</i>	Labre	IB		21	Atox
1	P43	Labridae	<i>Choerodon graphicus</i>	Perroquet wallis	Molluscivore	1800	40	Atox
1	P44	Labridae	<i>Choerodon graphicus</i>	Perroquet wallis	Molluscivore	200	20	Tox+
1	P45	Labridae	<i>Choerodon graphicus</i>	Perroquet wallis	Molluscivore	340	23	Atox
2	P16	Acanthuridae	<i>Naso unicornis</i>	Dawa	Herbivore	3000	45	Atox
2	P19	Acanthuridae	<i>Naso unicornis</i>	Dawa	Herbivore	2100	42	Atox
2	P23	Acanthuridae	<i>Naso unicornis</i>	Dawa	Herbivore	2500	43	Atox
2	P24	Acanthuridae	<i>Naso unicornis</i>	Dawa	Herbivore	1400	39	Atox
2	P25	Acanthuridae	<i>Naso unicornis</i>	Dawa	Herbivore	2000	42	Atox
2	P26	Scaridae	<i>Scarus rivulatus</i>	Perroquet	Herbivore	600	27	Atox
2	P27	Scaridae	<i>Scarus rivulatus</i>	Perroquet	Herbivore	600	27	Atox

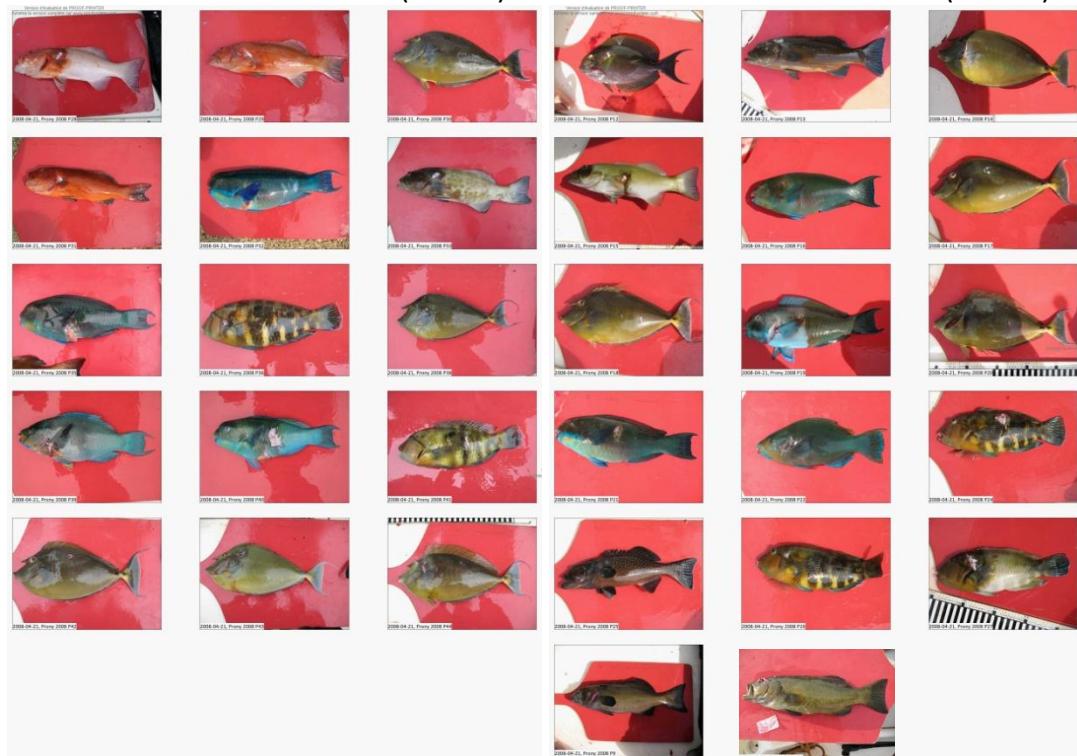
2	P28	Scaridae	<i>Scarus rivulatus</i>	Perroquet	Herbivore	640	28	Atox
2	P29	Scaridae	<i>Scarus rivulatus</i>	Perroquet	Herbivore	600	28	Atox
2	P30	Scaridae	<i>Scarus rivulatus</i>	Perroquet	Herbivore	780	30	Atox
2	P31	Scaridae	<i>Scarus rivulatus</i>	Perroquet	Herbivore	460	26	Atox
2	P17	Serranidae	<i>Plectropomus leopardus</i>	Saumonée	Carnivore	1200	39	Atox
2	P18	Serranidae	<i>Plectropomus leopardus</i>	Saumonée	Carnivore	1000	38	Atox
2	P20	Serranidae	<i>Plectropomus leopardus</i>	Saumonée	Carnivore	800	35	Atox
2	P21	Serranidae	<i>Plectropomus leopardus</i>	Saumonée	Carnivore	1000	38	Atox
2	P22	Serranidae	<i>Plectropomus leopardus</i>	Saumonée	Carnivore	1200	40	Atox
3	P01	Acanthuridae	<i>Naso unicornis</i>	Dawa	Herbivore	3500	48	Atox
3	P04	Acanthuridae	<i>Naso unicornis</i>	Dawa	Herbivore	3500	48	Atox
3	P11	Acanthuridae	<i>Naso unicornis</i>	Dawa	Herbivore	2200	43	Atox
3	P12	Acanthuridae	<i>Naso unicornis</i>	Dawa	Herbivore	2900	48	Atox
3	P13	Acanthuridae	<i>Naso unicornis</i>	Dawa	Herbivore	1400	39	Atox
3	P02	Scaridae	<i>Chlorurus microrhinos</i>	Perroquet	Herbivore	1100	35	Atox
3	P05	Scaridae	<i>Chlorurus microrhinos</i>	Perroquet	Herbivore	1100	35	Atox
3	P10	Scaridae	<i>Chlorurus microrhinos</i>	Perroquet	Herbivore	1800	40	Atox
3	P14	Scaridae	<i>Chlorurus microrhinos</i>	Perroquet	Herbivore	1700	40	Atox
3	P15	Scaridae	<i>Chlorurus microrhinos</i>	Perroquet	Herbivore	1200	37	Atox
3	P03	Serranidae	<i>Plectropomus leopardus</i>	Saumonée	Carnivore	900	36	Atox
3	P06	Serranidae	<i>Plectropomus leopardus</i>	Saumonée	Carnivore	700	35	Atox
3	P07	Serranidae	<i>Plectropomus leopardus</i>	Saumonée	Carnivore	710	35	Atox
3	P08	Serranidae	<i>Plectropomus leopardus</i>	Saumonée	Carnivore	1500	45	Atox
3	P09	Serranidae	<i>Plectropomus leopardus</i>	Saumonée	Carnivore	1100	38	Atox

2008

Zone du Port (Zone 1)



Zone de Bonne Anse (Zone 2)



Zone de Port Boisée (Zone 3)



2009

Zone du Port (Zone 1)



Zone de Bonne Anse (Zone 2)



Zone de Port Boisée (Zone 3)



Annexe 8 : Diffusion de l'information scientifique

Publications écrites à comité de lecture

Kerbrat A.S., Amzil Z., Pawlowiez R., Golubic S., Sibat M., Chinain M., Laurent D. First evidence of palytoxin in *Trichodesmium cyanobacteria*: Possible implication in clupeotoxicism. *Marine Drugs*, en préparation.

Laurent D., Kerbrat A.S., Darius H.T., Haddad M., Golubic S., Pauillac S., Chinain M. Giant clam poisoning: a new ecotoxicological phenomenon related to marine benthic Oscillatoiales (cyanobacteria) blooms. Special issue, *Toxicon*, en préparation.

Kerbrat A.S., Darius H.T., Pauillac S., Chinain M., Laurent D., 2010. Detection of ciguatoxin-like and paralysing toxins in *Trichodesmium spp.* from New Caledonia lagoon. Special issue, *Marine Pollution Bulletin*, doi : 10.1016/j.marpolbul.2010.06.017.

Méjean A., Peyraud-Thomas C., Kerbrat A.S., Golubic S., Pauillac S., Chinain M., Laurent D., 2009. First identification of the neurotoxins anatoxin-a and homoanatoxin-a from *Hydrocoleum spp.* marine cyanobacterium. Special issue, *Toxicon*, doi : 10.1016/j.toxicon.2009.10.029.

Laurent D., Kerbrat A.S., Darius H.T., Girard E., Golubic S., Benoit E., Sauviat M.P., Chinain M., Molgó J., Pauillac S., 2008. Are cyanobacteria involved in Ciguatera Fish Poisoning-like outbreaks in New Caledonia? *Harmful Algae* 7(6), 827-838.

Laurent D., Kerbrat A.S., De Fremicourt I., Darius H.T., Chinain M., Pauillac S. Involvement of cyanobacteria in the tropical ecotoxicological phenomenon of ciguatera fish poisoning. 12th international conference on Harmful Algae, Copenhagen, Danemark.

Publications écrites sans comité de lecture

Kerbrat A.S., Videault A., Pauillac S., Chinain M., Laurent D. *Ciguatera and man's influence in New Caledonia*. Doctoriales UNC UPF 2009, Tahiti, Polynésie Française (ISBN: 978-2-9534554-0-3).

Communications aux congrès, doctoriales (présentations orales, affiches)

Kerbrat A.S., Chinain M., Laurent D. Phénomène écotoxicologique de la ciguatera: Implication des cyanobactéries et impact anthropique, vers une meilleure gestion des risques. Présentation orale - Doctoriales UNC 2009, Nouméa, Nouvelle-Calédonie, 14 octobre 2009.

Kerbrat A.S., Darius H.T., Golubic S., Pauillac S., Chinain M., Laurent D. Ciguatera Shellfish Poisoning: a new ecotoxicological phenomenon related to marine Oscillatoiales (cyanobacteria) blooms? – Oral presentation- 11th Pacific Science Inter-Congress, Tahiti, Polynésie Française; 2-6 March, 2009

Kerbrat A.S., Darius H.T., Pauillac S., Chinain M., Laurent D., Detection of ciguatoxin-like and paralysing toxins in *Trichodesmium spp.* from New Caledonian lagoon. - Octobre 2008 Oral presentation - Ciguatera and related biotoxins workshop, Nouméa, New Caledonia; 27-31 October, 2008.

Kerbrat A.S., Videault A., Pauillac S., Chinain M., Laurent D. *Ciguatera and man's influence in New Caledonia*. – Poster - Ciguatera and related biotoxins workshop, Nouméa, New Caledonia; 27-31 October, 2008.

Kerbrat A.S., Chinain M., Laurent D. Vers une meilleure gestion du phénomène écotoxicologique de la ciguatera : Etude des micro-organismes toxiques associés et des facteurs favorisant le développement des zones ciguatérigènes. – Présentation orale - Doctoriales UNC 2008, Nouméa, Nouvelle-Calédonie, 10 octobre 2008.

Kerbrat A.S., Darius H.T., Golubic S., Palinska K., Pauillac S., Chinain M., Laurent D. - Involvement of Oscillatoriales (cyanobacteria) in the ecotoxicological phenomenon of Ciguatera Fish Poisoning (CFP) - Poster - 15^{èmes} Rencontres en toxinologie "Toxines émergentes: nouveaux risques", MNHN, Paris.

Peyraud-Thomas C., Kerbrat A.S., Golubic S., Pauillac S., Chinain M., Méjean A., Laurent D. - First identification of marine anatoxin-a producing cyanobacteria from South Pacific - Poster 15^{èmes} Rencontres en toxinologie "Toxines émergentes: nouveaux risques", MNHN, Paris.

Communications de vulgarisation sous forme d'affiche ou de présentation orale

- Participations à divers manifestations locales (2 posters) : Fête du Wajuyu (du vivaneau) à Maré en novembre 2007 ; Fête de la science à Nouméa en octobre 2008 et à Poindimié en octobre 2009,
- Réunion de restitution des travaux à la tribu d'Hunëtë (Lifou) aux Journées de l'Environnement en juin 2008,
- Réunion d'informations à Emao, Vanuatu (Poster en anglais et bichlamar) en Mai 2009,
- Réunion de restitution des travaux à Ouvéa en juillet 2010.



Are cyanobacteria involved in Ciguatera Fish Poisoning-like outbreaks in New Caledonia?

Dominique Laurent^{a,*}, Anne-Sophie Kerbrat^a, H. Taiana Darius^b, Emmanuelle Girard^c, Stjepko Golubic^d, Evelyne Benoit^c, Martin-Pierre Sauviat^e, Mireille Chinain^b, Jordi Molgo^c, Serge Pauillac^f

^a Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles et Pharmacophores Redox, UMR152 IRD – Université Paul Sabatier Toulouse III, centre IRD de Nouméa, BP45, 98848 Nouméa, New Caledonia

^b Laboratoire des Microalgues Toxiques, Institut Louis Malardé, BP30, 98713 Papeete, Tahiti, French Polynesia

^c CNRS, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard - FRC2118, Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire - UPR9040, Gif sur Yvette F-91198, France

^d Biological Science Center, Boston University, 5 Cummington Street, Boston, MA 02215, USA

^e Laboratoire d'Optique et Biosciences, INSERM U 696-CNRS UMR 7645-X ENSTA, Ecole Polytechnique, 91128 Palaiseau, France

^f Laboratoire des Biotoxines, Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, BP61, 98845 Nouméa, New Caledonia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 April 2008

Accepted 18 April 2008

Keywords:

Ciguatera Fish Poisoning
Cyanobacteria
Epidemiology
Hydrocoleum
Toxicology

ABSTRACT

From 2001 to 2005, numerous cases of seafood poisonings were reported in a tribe from Lifou (Loyalty Islands Province, New Caledonia) of which 35 were thoroughly examined. Observations outlined by the epidemiological and clinical data (including severity and rapid onset of certain symptoms following consumption of either giant clams (*Tridacna* spp.) or grazing and molluscivorous fish together with the apparent inefficacy of traditional remedies, were not in favour of a classical Ciguatera Fish Poisoning (CFP) outbreak. From 2005 onwards, an environmental offshore survey of the affected area was conducted. Screening of the damaged coral area revealed the presence of large populations of cyanobacteria identified as *Hydrocoleum* Kützing, but the absence of *Gambierdiscus* spp., the well-known dinoflagellate causative agent of CFP. *In vivo* and *in vitro* toxicological studies of extracts obtained from cyanobacteria and giant clams, strongly suggested the co-occurrence of ciguatoxin-like, anatoxin-like and paralytic shellfish toxins in these samples.

These new findings shed new light on the complexity of the CFP symptomatology and treatment and also on the diversity and origin of the CFP toxins. Furthermore they provide new evidence of the overall variability of seafood poisonings following the ingestion of different sea products living in a marine environment where significant harmful populations of microalgae and cyanobacteria coexist.

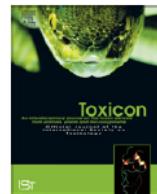
This is the first report on the involvement of cyanobacteria in CFP-like outbreaks following the consumption of giant clams or fish specimens. Consequently, it is recommended that CFP risk assessment programs now include monitoring of cyanobacteria besides the obvious screening of CFP-promoting dinoflagellates.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicon

First identification of the neurotoxin homoanatoxin-a from mats of *Hydrocoleum lyngbyaceum* (marine cyanobacterium) possibly linked to giant clam poisoning in New Caledonia

Annick Méjean^{a,b,c}, Caroline Peyraud-Thomas^a, Anne Sophie Kerbrat^{d,e}, Stjepko Golubic^f, Serge Pauillac^g, Mireille Chinain^h, Dominique Laurent^{d,*}

^aUnité des Cyanobactéries (CNRS URA 2172), Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France

^bLaboratoire de Biochimie des microorganismes: enzymologie, métabolisme et antibiotiques (UMR CNRS 7223), ENSCP, 11 rue Pierre et Marie Curie, 75231 Paris Cedex 05, France

^cUniversité Paris Diderot-Paris 7, 75013 Paris, France

^dUniversité de Toulouse; UPS; UMR 152 (Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles et Pharmacophores Redox), 118, rte de Narbonne, F-31062 Toulouse Cedex 9, France

^eIRD; UMR 152; F-98 848 Nouméa, New Caledonia

^fBiological Science Center, Boston University, 5 Cummington Street, Boston, MA 02215, USA

^gInstitut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, Laboratoire des Biotoxines, BP61, 98845 Nouméa, New Caledonia

^hInstitut Louis Malardé, Laboratoire des Microalgues Toxiques, BP30, 98713 Papeete, Tahiti, French Polynesia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 March 2009

Received in revised form 22 October 2009

Accepted 26 October 2009

Available online 4 November 2009

Keywords:

Marine cyanobacteria

Anatoxin-a

Homoanatoxin-a

Hydrocoleum spp.

Seafood poisoning

ABSTRACT

We report the first identification of homoanatoxin-a from benthic marine cyanobacteria (*Hydrocoleum lyngbyaceum*) samples collected in Lifou (Loyalty Islands, New Caledonia), where cases of giant clams (*Tridacna maxima*) intoxications were recorded during a severe ciguatera fish poisoning outbreak. Homoanatoxin-a was also detected in extracts of giant clams harvested in the surroundings of the contaminated area suggesting the possible link between these poisoning events and the occurrence of potentially neurotoxic *Hydrocoleum*.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect

Marine Pollution Bulletin

journal homepage: www.elsevier.com/locate/marpolbul

Detection of ciguatoxin-like and paralysing toxins in *Trichodesmium* spp. from New Caledonia lagoon

Anne-Sophie Kerbrat ^{a,b}, H. Taiana Darius ^c, Serge Pauillac ^d, Mireille Chinain ^c, Dominique Laurent ^{a,b,*}^a Université de Toulouse, UPS, UMR152 (Laboratoire Pharmacochimie des Substances Naturelles et Pharmacophores Redox), 118, Route de Narbonne, F-31062 Toulouse Cedex 9, France^b IRD, UMR152, 98848 Nouméa, Nouvelle-Calédonie, France^c Laboratoire des Micro-algues Toxiques, Institut Louis Malardé, BP 30, 98713 Papeete, Tahiti, French Polynesia^d Laboratoire des Biotoxines, Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, BP 61, 98845 Nouméa, Nouvelle-Calédonie, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Cyanobacteria
Trichodesmium spp.
 Ciguatoxin-like compounds
 Paralysing toxins
 New Caledonia

ABSTRACT

Marine pelagic cyanobacteria *Trichodesmium* are widespread in the New Caledonia lagoon. Blooms of these Oscillatoriales are suspected to be a potential source of toxins in the ciguatera food chain and were previously reported to contain certain types of paralysing toxins. In the present study, toxicity experiments were conducted on lipid- and water-soluble extracts of freeze-dried samples of these cyanobacteria. Lipid-soluble fractions revealed a ciguatoxin-like activity in both *in vivo* (mouse bioassay) and *in vitro* (mouse neuroblastoma cells assay and receptor binding assay using tritiated brevetoxin-3) assays. The water-soluble fractions tested on mice exhibited neurotoxicity with paralytic symptoms. These toxicities have also been observed with benthic filamentous cyanobacteria within the Oscillatoriales order, also collected in New Caledonia. This study provides an unprecedented evidence of the toxicity of *Trichodesmium* species from the New Caledonia lagoon. This survey also demonstrates the possible role of these cyanobacteria in ciguatera fish poisoning.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Involvement of Oscillatoriales (cyanobacteria) in the ecotoxicological phenomenon of Ciguatera Fish Poisoning (CFP)



Anne-Sophie Kerbrat¹, H. Taina Darius², Stjepko Golubic³, Katarzyna Palinska⁴, Serge Paulliac⁵, Mireille Chinain², Dominique Laurent¹

(¹) Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles et Pharmacophores Redor, UMR152 IRD – Université Toulouse III Paul Sabatier, centre IRD de Nouméa, BP45, 98848 Nouméa, New-Caledonia

(²) Laboratoire des Micro-algues Toxiques, Institut Louis Malardé, BP30, 98713 Papeete, Tahiti, French Polynesia

(³) Biological Science Center, Boston University, 5 Cummings Street, Boston, MA 02215, USA

(⁴) Institut für Chemie und Biologie des Meeres, Geomicrobiology, CVO University of Oldenburg, Oldenburg, Germany

(⁵) Laboratoire des Biotoxines, Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, BP61, 98845 Nouméa, New-Caledonia



Hunète, Lifou, New-Caledonia

Ciguatera is a form of seafood poisoning caused by eating tropical coral reef fish that are carriers of the Ciguatoxins (CTX). Since 30 years, scientific community discovered a benthic dinoflagellates belonging to the genus *Gambierdiscus* identified as a primary causative agents¹. These unicellular microphytic algae synthesize toxins that are concentrated and biotransformed by hydroxylation along the food chain².

During 2005 to 2007, following public health alert, on the island Lifou (Loyalty Islands, New-Caledonia) and in Raivavae (Australes Archipelago, French Polynesia), ecotoxicological surveys were carried out. In the affected areas, *Gambierdiscus* spp. cells were either absent or present at very low density. In contrast, some large mat-forming benthic cyanobacteria were observed in both areas and were suspected as sources of toxins³.

The aim of this study is to identify these organisms and to test them for toxicity. Concurrently, the toxicity of the pelagic cyanobacterium *Trichodesmium*, common in the New Caledonian lagoon was also tested.



Raivavae, Australes Archipelago, French Polynesia

Sampling and extraction

Sample collection Batches of several mat-forming cyanobacteria were collected in each area (for each approximately 1L). Samples of the filaments from each batch are fixed in 5% formaldehyde solution for the morphological identification.

Preparation of lipid-soluble extract Freeze-dried bundle of cyanobacteria was extracted with methanol with sonication and agitation. Evaporated residue was partitioned between water mixed with methanol and diethyl ether⁴. Lipid-soluble extract was tested *in vitro* and *in vivo* following described tests below.

Tests *in vitro* and *in vivo*

Neuroblastoma cytotoxicity assay Neuroblastoma (Neuro-2A) bioassay was developed by Manger to detect sodium channel-enhancing marin toxins⁵. After seeded 24 h incubated into 96-well plates at a concentration of 2.5×10^3 cells mL^{-1} , cells were treated with ouabaine (10 mM) and veratridine (1 mM) and incubated 14 h in contact with lipid-soluble extract. After treatment, cell viability was measured using the tetrazolium salt MTT. The absorbance of its reduced form produced by active cells, measured at 490nm. Results are expressed as inhibitory concentration at 50% (IC_{50}).

Receptor binding assay (RBA) This test measures the binding of a constant low concentration of tritiated brevetoxin ($[^{3}\text{H}]$ PbTx-3) to its specific receptor on the sodium channel of rat brain cells in the presence of unlabeled toxin contained in the lipid-soluble extract. Radioactivity was measured with a scintillation analyzer. RBA toxicity of samples was expressed as μg equivalents P-CTX-3C g^{-1} of extract.

Mouse bioassay Mice (OF1) were injected with lethal and sub-lethal doses. For each, 2 animals were intra-peritoneally administrated and mice were observed during 48 h.

➤ Morphological analysis revealed that these cyanobacteria belong to different genera

within the order Oscillatoriales: *Hydrocoleum*, *Oscillatoria* and *Phormidium* in Lifou, and

Oscillatoria in Raivavae. Populations of the planktonic oscillatorialean genus *Trichodesmium* genetically close to *Hydrocoleum*⁶ were sampled in the South-Eastern New Caledonian lagoon.



Massive occurrences of toxic cyanobacteria in their habitats (left) and the microscopic properties (right). Scale bar is 10 μm long for all pictures excepted for *Oscillatoria* sp. which is 20 μm .

➤ *In vitro* toxicity tests (cytotoxicity assay and RBA) conducted with lipid-soluble extracts of these cyanobacteria are consistent with the presence of "ciguatoxin-like" compounds.

Samples	Cytotoxicity assay IC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	RBA Affinity ($\mu\text{g equiv CTX-3C g}^{-1}$ d'extract)
<i>Phormidium</i> sp.	35 ± 4	8.68 ± 2.09
<i>Oscillatoria</i> sp. (Raivavae)	-	3.40 ± -
<i>Oscillatoria</i> sp. (Lifou)	55 ± 3	-
<i>Hydrocoleum</i> spp.	-	3.05 ± 0.68
<i>Trichodesmium</i> spp.	190 ± 10	2.05 ± 0.46

The mouse bioassay revealed symptoms different from typical ciguatoxin effects consisting of an onset of quiescence, dyspnea, reduced-reflex, lachrymation and hind-limb paralysis during 48 h of observation.

- ✓ These new findings suggest that besides the current screening for dinoflagellates as obvious indicators of CFP, CFP risk assessment programs should now include monitoring of cyanobacteria.
- ✓ Further investigations are currently underway by liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC/MS) to resolve the chemical nature of these toxins.

Acknowledgements

We thank the tribe of Hunète especially Basile et Marianna Ijezie, Martial Ehnyimane and Antoine Holue and the inhabitants of Raivavae Atol for their help and participation in this study. We thank Robert Le borgne for providing samples and photos of *Trichodesmium*. This work was supported with the French Minister of the research and Goro-Nickel (Bourse Cifre).

References

- ¹ Bergis (1977) - *Toxicol.*, **18**, 199-208; Lewis (1993) - *Comparative Biochem. Physiol.*, **106C(3)**, 615-626;
- ² Laurent (2007) - *Harmful Algae* [in press]; ³Manger (1993) - *Analytical Biochemistry*, **214**, 190-194;
- ⁴Eendeen (1993) - *Toxicol.*, **31(9)**, 1155-1165; ⁵Abel (2006) - *FEMS Microbiol. Lett.*, **260**, 171-177

First identification of marine anatoxin-a producing cyanobacteria from south Pacific

Caroline Peyraud-Thomas¹, Anne-Sophie Kerbrat², Stjepko Golubic³, Serge Paullac⁴, Mireille Chinain⁵, Annick Méjean¹, Dominique Laurent²

(1) Unité des Cyanobactéries, URA CNRS 2172, Institut Pasteur, CNRS URA 2172, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15

(2) Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles et Pharmacophores Redox, UMR152 IRD-Université Toulouse III Paul Sabatier, centre IRD de Nouméa, BPA5, 98848 Nouméa, Nouvelle Calédonie

(3) Biological Science Center, Boston University, 5 Cummington Street, Boston, MA 02215, USA

(4) Laboratoire des biotoxines, Institut Pasteur de Nouvelle Calédonie, BP61, 98845 Nouméa, Nouvelle Calédonie

(5) Laboratoire des Micro-algues Toxiques, Institut Louis Malardé, BP30, 98713 Papeete, Tahiti, Polynésie française

INTRODUCTION

In 2002, 30 severe human intoxications occurred after eating tropical reef fish and giant clams in Lifou, a Loyalty's Island of New Caledonia. Signs of intoxication indicated acute poisoning due to a neurotoxin. Benthic cyanobacteria were found over the rubble of dead corals in the fishing area but no dinoflagellate *Gambierdiscus* spp. The presence of the cyanobacterial neurotoxin alkaloid anatoxin-a (ANTX) and/or its methyl homolog, homoanatoxin-a (HANTX), was examined by using gas chromatography-mass spectrometry in extracts of cyanobacteria samples collected from the affected areas in Lifou.

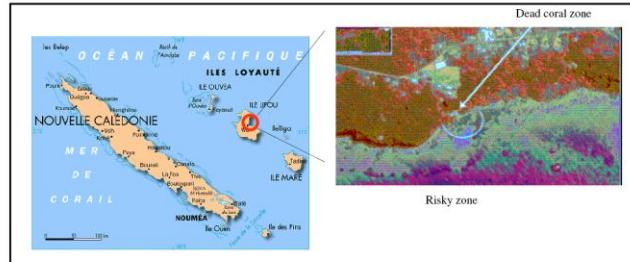


Figure 1 : Localisation of the fishing area where intoxications occurred

METHODS

Benthic cyanobacteria samples were collected from fishing area. Samples fixed in 5% formaldehyde were examined by light microscopy, for morphological identification of cyanobacterial representatives. Anatoxin-a content was analysed by using Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry. A PCR amplification of the ITS (Intergenic Transcribed Spacer) region was performed on samples in 50% ethanol (v/v). The nucleotide sequences obtained were aligned using ClustalX in bioedit-software version 1.83.

RESULTS

Microscopic observations

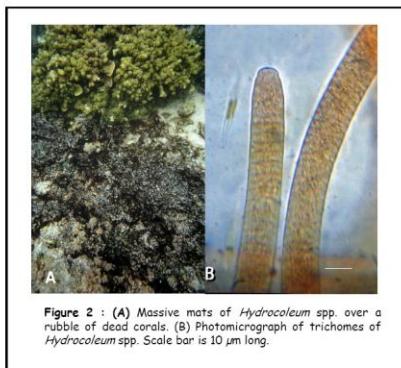


Figure 2 : (A) Massive mats of *Hydrocoleum* spp. over a rubble of dead corals. (B) Photomicrograph of trichomes of *Hydrocoleum* spp. Scale bar is 10 µm long.

GC/MS Analysis

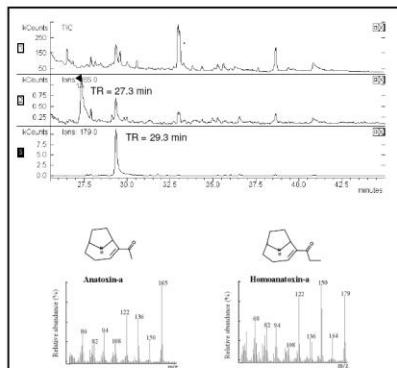


Figure 3 : GC/MS chromatogram of extracts from mats of *Hydrocoleum* spp. EI mass spectrum at a retention time (TR) of 27.3 min characteristic of anatoxin-a (molecular ion m/z 165 and fragments m/z 150, 136, and 122). EI mass spectrum at retention time of 29.3 min characteristic of homoanatoxin-a (molecular ion m/z 179 and fragments m/z 164, 150, 136, and 122).

ITS sequence Analysis

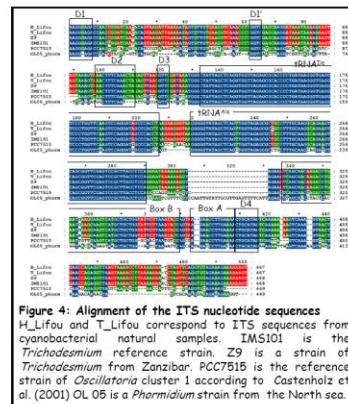


Figure 4: Alignment of the ITS nucleotide sequences. H_Lifou and T_Lifou correspond to ITS sequences from cyanobacterial natural samples. IMS101 is the *Trichodesmium* reference strain. Z9 is a strain of *Trichodesmium* from Zanzibar. PCCTB15 is the reference strain of *Oscillatoria* cluster 1 according to Castenholz et al. (2001). OL 05 is a *Phormidium* strain from the North sea.

- Extensive mats were observed in the fishing area on dead branched corals during the warm period from November to April 2006. They are dominated by species of *Hydrocoleum* Kützing ex Gomont (= *Blennothrix* Kützing ex Anagnostidis and Komárek 1988).
- The most common organism *H. lyngbyaceum* Kützing is characterized by trichomes of fairly constant diameter of $11.52 \pm 0.79 \mu\text{m}$. This species is characterized by short cells, 2 - 5 μm length, by straight and shortly attenuated trichome ends with capitulated, hourglass-shaped end cells, covered by a thickened cell wall (calyptra).
- Anatoxin-a and Homoanatoxin-a were both detected in extracts from mats of *Hydrocoleum* collected.

CONCLUSION

For the first time, anatoxin-a was detected in marine sample and could possibly be related to the poisoning episodes. Furthermore, a new marine anatoxin-a producing cyanobacterium belonged to the Oscillatoriales order is suggested.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by The Institut Pasteur, the CNRS URA 2172, the Programme "Multorganismes" from Aventis Pharma (Groupe Sanofi-Aventis) - Böehringer Ingelheim, and the Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail, project "Environnement et Santé" (AFSSET). C. Peyraud-Thomas was a recipient of a fellowship from Programme "Multorganismes" from Aventis Pharma (Groupe Sanofi-Aventis) - Böehringer Ingelheim.

REFERENCES

Castenholz, (2001). Subsection III, order Oscillatoriales (Elenkin 1934), p. 539-562. In D. R. Boone, R.W. Castenholz, and G.M. Garrity (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd ed., vol.1. Springer-Verlag, New York, NY. Abed (2006)-FEMS Microbiol Lett, 260, 171-177. Anagnostidis and Komárek (1988), Gomont, 1892. Ann. Sci. Nat. Bot., ser. 7, 15: 332.

CIGUATERA AND MAN'S INFLUENCE IN NEW CALEDONIA

The Bay of Prony, construction site of nickel plant and
Ouvea, tropical atoll "safe" from ciguatera outbreaks

A.S. Kerbrat^{1,2}, A. Videault¹, S. Pauillac³, M. Chinain⁴, D. Laurent^{1,2}

¹ IRD, Centre IRD de Nouméa, BP A5, 98843 Nouméa, New Caledonia; UMR152, F-31062 Toulouse, France

² Université de Toulouse; UPS; UMR152 (Laboratoire Pharmacochimie des substances naturelles et pharmacophores redox); 118, route de Narbonne, F-31062 Toulouse cedex 9, France

³ Laboratoire des BioToxines, Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, BP 61, 98845 Nouméa, New Caledonia

⁴ Laboratoire des Microalgues Toxiques, Institut Louis Malardé, BP30, 98713 Papeete, Tahiti, French Polynesia



Ciguatera is a common marine intoxication, caused by the consumption of coral reef fish which accumulate toxins through their diet. It is an ecotoxicological phenomenon induced by natural or man-made disturbances of coral reef ecosystems. This is followed by the proliferation of macro-algae which are ideal substrates of micro-organisms. Among these, certain strains of the dinoflagellate *Gambierdiscus* spp. are known to produce ciguatoxins (CTXs), responsible for human intoxications. More recently, benthic cyanobacteria were also incriminated as potential progenitors of CTX-like compounds¹.

Environmental and anthropic factors enhancing the proliferation of these micro-organisms, resulting in ciguatera outbreaks, are still unclear. In order to improve the management of the risk of ciguatera outbreaks, large-scale surveys in New Caledonia were undertaken in two sites chosen for their particular situation: (i) the Bay of Prony, currently in development of port facilities for mining construction and (ii) the lagoon of Ouvéa reputed to be free of ciguatera. Here, we present the methodology of our on-going survey and some of the preliminary results obtained.

Micro-organisms

Collection and observations

Gambierdiscus species and microscopic cyanobacteria populations are being monitored by the following method (a-b). Epiphytic macro-algae are collected and vigorously shaking in a plastic bag. The sea-water containing cells dislodged from their support is filtered successively through 500, 250 and 45 µm-mesh sieves. The resulting retentate is fixed in 5% formaldehyde solution for microscopic observations² (c-h). For the cyanobacteria in colonies, they are easily collected by hand and fixed as above (i-l).

Extraction

When collected in sufficient quantity in time of bloom, extraction are carried out as described previously².



Fish

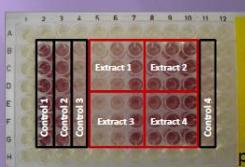
Sampling In each fish sampling area, defined according presence or absence of anthropic actions, three types of fish with different feeding modes are targeted (two herbivores and one carnivore; m). Carried out annually, five individuals per type are fished, identified, measured and weighted. The flesh is conditioned into fillets and stored at -30°C until extraction

Extraction Based on method already developed³, filleted flesh are ground. Extraction is carried out with methanol on 5 g of homogenized flesh (n=3). The crude extract is disposed on Sep-Pak®C18 cartridges and the fraction obtained with 10% aqueous methanol are concentrated and stored at 4°C for test in neuroblastoma cytotoxicity assay (n).



Analysis of ciguatoxicity

Neuroblastoma cytotoxicity assay Neuroblastoma (Neuro-2A) bioassay was specially developed to detect sodium channel-enhancing marine biotoxins⁴. Based on this, our detection test consisted of incubating ouabain, veratridine and the sampled extract for 14 h. Each extract is tested in triplicates at 3 concentrations (6.3 to 25.0 fresh flesh eq g/mL). After treatment, cell viability is measured using the tetrazolium salt MTT at 490 nm (p).



The Bay of Prony The monthly monitoring undertaken over 4 last years has not revealed any efflorescence neither of *Gambierdiscus* nor of cyanobacteria.

Ouvéa From the two sampling missions conducted in the cold season, no blooms of *Gambierdiscus* were observed, although, their presences were detected under the microscope in the samples collected near the wharf of Wadrilla. From two other sampling sites, mat-forming filamentous cyanobacteria belonging to the genus of *Hydrocoleum* and *Phormidium* were collected. Ciguatoxicity analysis on this sample is currently underway.

Potential ciguatoxicity in the marine food web in fishes collected from different sites of Ouvéa and of Bay of Prony is in course of analysis.

Acknowledgements

We would like to thank J. Butscher, M. Claque, N. Colombani, S. Tereua, S. Virly, Ty Jomessi, the inhabitants of Ouvéa for their marine sampling assistance and participation in this study and G. Mou-Tham and S. Golubic for their help in fish and cyanobacteria identification respectively. This work was supported with the French Minister of the research and Goro-Nickel (Cifre fellowship) and the direction of Province des îles.

References

- ¹Laurent (2008) - Harmful Algae 7(6), 827-838; ²Chinain (1999) - Journal of Phycology 35, 1282-1296; ³Danis (2007) - Toxicol 50 (2007) 612-626; ⁴Manger (1993) - Analytical Biochemistry, 214, 190-194





CIGUATERA

Ciguatera is an intoxication caused by tropical fishes or shellfishes contaminated with ciguatoxins.



1. Accumulation of toxins through the food chain



3. How to prevent

<i>Occidental remedies</i>	<i>Traditional medicine</i>
Treating the symptoms	≈ 100 plants from South Pacific
<ul style="list-style-type: none"> • Mannitol • Vitamins B1, B6, B12 • Calcium gluconate • Atropine 	<ul style="list-style-type: none"> • Heliotrope Tree - Decoction of yellowed leaves • Pink pepper - Infusion of leaves • Coconuts - Decoction of roots

At IRD (Nouméa) and ILM (Papeete), work is underway on traditional herbal medicine in order to put forward a new remedy against the ciguatera as an effective alternative to the supportive occidental therapy.

5. Monitoring and research

1) Collect information from inhabitants

2) Micro-organisms



3) Assessment of toxicity



Anne-Sophie KERBRAT, IRD - kerbrat@noumea.ird.nc / Being YEETING, SPC Coastal Fisheries – BeingY@spc.int

- There is no fish poisoning season;
- Get advice from fishermen about ciguatera-free fishing grounds
- Do not rely on flies, ants or coins to detect a poisonous fish — these techniques have misled many people. Cats are more sensitive than humans, therefore the cat test will work but this is not recommended as cruelty to animals will then become an issue.

*For further
information*

Information
Laurent D. et al., 2005.
In: SPC and IRD (Eds),
Ciguatera : un guide pratique. Laurent D.,
1993.
ORSTOM (Eds), La
gratte ou ciguatera. Ses
remèdes traditionnels
dans le Pacifique sud.
Or contact Vanuatu
Fisheries Department
long Tel. 23119 or
23621.

Titre de la thèse : Rôle des cyanobactéries dans le développement des zones ciguatérigènes en lien avec les impacts anthropiques, pour une meilleure gestion du risque ciguatérique (Résumé long)

Introduction. La ciguatéra est l'intoxication par produits marins la plus fréquente au monde. Elle est consécutive à l'ingestion de poissons récifaux porteurs de toxines et se manifeste chez l'Homme par des désordres neurophysiologiques (symptômes digestifs, neurologiques, cardiovasculaires, généraux). Bien connue des populations des régions intertropicales, elle désigne également le phénomène écologique lié aux perturbations naturelles ou anthropiques des écosystèmes coralliens. Le développement de zone ciguatérique est très souvent induit par des modifications de facteurs environnementaux. La création de «nouvelles surfaces» due à la destruction corallienne d'origine naturelle (tsunami, cyclone, pluies exceptionnelles...) ou anthropique (eutrophisation, dragage, construction de digue ...), favorise la prolifération de microorganismes ciguatoxinogènes. Ces substrats vierges peuvent être colonisés par des macroalgues opportunistes, supports privilégiés des dinoflagellés du genre *Gambierdiscus*. Ces micro-organismes naturellement présents sont connus pour être de potentiel producteur de ciguatoxines, molécules polyéthéryées accumulées et biotransformées le long de la chaîne trophique. Récemment, il a été montré que certaines espèces de cyanobactéries pouvaient également être impliquées dans des cas d'intoxications de type ciguatérique. Ces micro-organismes, les facteurs favorisant leur prolifération et donc les potentielles flambées ciguatériques ne sont pas encore bien connus.

Dans ce contexte, l'objectif général de la thèse est de mieux comprendre le déterminisme ciguatérique afin de mieux le prévenir. L'étude a donc constitué en un suivi de la toxicité potentielle des zones à risque et de leur évolution, ainsi que de caractériser le type toxinique des organismes contaminés.

Méthodologie. Différents sites d'étude ont été sélectionnés en Nouvelle-Calédonie selon leurs particularités : (i) à Lifou (tribu de Hunêtë), zone de pêche réputée毒ique qui nous a permis de mettre en évidence une forme de ciguatoxicité chez des cyanobactéries benthiques de l'ordre des Oscillatoriæ, (ii) la baie de Prony, site en cours d'anthropisation avec l'implantation d'une usine métallurgique, et (iii) l'atoll d'Ouvéa, réputé non ciguatérique.

Une méthodologie d'étude spécifique est développée incluant le suivi de la diversité microbienne et l'évaluation de la toxicité de certains maillons de la chaîne trophique (cyanobactéries, bénitiers et poissons). Le travail de laboratoire s'est porté sur le traitement des échantillons récoltés (extraction des toxines par séparation liquide-liquide et/ou extraction rapide sur colonne de chromatographie en phase inverse) puis des analyses de toxicité des extraits obtenus ont été réalisées. Les tests sur souris, de cytotoxicité et de compétition radio ligand ont été utilisés afin de déterminer le type de toxines impliquées et quantifier le potentiel toxique.

Résultats. Le suivi écotoxicologique de la zone de pêche de Lifou a mis en évidence la dualité de toxicité chez d'autres cyanobactéries de l'ordre des Oscillatoriæ dominant et maintenant l'écosystème dégradé. Les résultats des tests sur cellules mettent en évidence la toxicité de type ciguatoxique de certains poissons, des bénitiers et des cyanobactéries. Les tests sur souris révèlent la présence de toxines de type paralysant probablement produites par les cyanobactéries et transmises aux bénitiers. Les études chromatographiques ont permis de caractériser, pour la première fois une neurotoxine paralysante (homoanatoxine-a) à la fois chez une cyanobactérie (*Hydrocoleum lyngbyaceum*) et chez un bénitier (*Tridacna maxima*) récolté dans la même zone récifale.

D'autre part, afin d'appuyer l'hypothèse du rôle des cyanobactéries benthiques dans la contamination de la chaîne alimentaire, l'étude d'une Oscillatoriæ pélagique, *Trichodesmium*, a révélé une toxicité de type ciguatoxique et paralysant. Et, pour la première fois, la palytoxine a été caractérisée chez *Trichodesmium erythraeum*.

Enfin, le suivi environnemental dans la baie de Prony, zone d'installation d'une usine de production de nickel et d'une base portuaire, associée à celle d'Ouvéa, zone reconnue indemne de ciguatéra, a permis la mise en place d'un outil de surveillance sanitaire et écologique opérationnel en considérant également les cyanobactéries. Compte tenu des populations de micro-organismes présentes et du nombre de poissons toxiques, ces deux sites présentent un faible risque ciguatérique.

Conclusions. Notre étude menée en Nouvelle-Calédonie s'oriente vers une approche plus globale des micro-organismes vecteurs (dinoflagellés et cyanobactéries) et par là même, une meilleure connaissance des facteurs influençant leur prolifération. Ces travaux qui apportent une meilleure compréhension du phénomène écotoxicologique permettent de proposer une redéfinition du schéma de transmission de la ciguatéra dont la dénomination anglo-saxonne pourrait être ***Ciguatera Seafood Poisoning***.

Mots Clés : Ciguatéra - Cyanobactérie - Bénitier - Déterminisme - Ciguatoxine - Cyanotoxine