



Étude de la contamination d'échantillons de requins par des biotoxines à l'aide de bio-essais sur souris et d'essais de cytotoxicité sur des cellules neuronales (neuro 2A) dans le cadre du programme Valorequins.

- Rapport d'analyse -

Maîtrise d'ouvrage : **CRPMEM (Comité Régional des Pêches Maritimes et Elevages Marins)**
47 rue Evariste de Parry, BP 295,
97 827, Le Port Cedex
Tél : 02 62
Contact : lcourtois.crpm@wanadoo.fr



Maître d'œuvre : **HYDROREUNION**
c/o CYROI, 2, rue Maxime Rivière,
97 490 Sainte-Clotilde, La Réunion
Tél : 02 62 93 88 10
Contact : jean.turquet@hydroreunion.re

Partenaire : **IRTA (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries)**
Ctra. De Poble Nou, Km 5,5
E-43540 Sant Carles de la Ràpita (Tarragona) Spain
Contact : jorge.diogene@irta.cat



Version finale

1. Contexte

Le présent rapport présente les résultats obtenus dans le cadre de la convention de prestation passée entre le CRPMEM et HydrôRéunion (convention initialement passée avec l'ARVAM, puis transférée vers HydrôRéunion en janvier 2015).

Cette prestation fait suite à une première acquisition de données réalisée pour le compte de la Préfecture de la Réunion (DAAF, Service de l'alimentation). 24 requins prélevés en 2012 et 2013 ont été analysés par bio-essais souris ; l'Anses a complété l'approche avec l'analyse de ces mêmes échantillons par test de cytotoxicité sur cellule neuro2A. L'ensemble des résultats n'ont pas montré la présence de toxines de type ciguatoxines au-delà de la limite de détection de 0,04 µg. eq P-CTX- Kg⁻¹.

Le présent rapport porte sur quatre-vingt-dix échantillons de requins collectés au travers des projets Caprequins 2 et Valorequins. Ils ont été analysés, comme pour la phase 1, par bio-essais souris et par essai de cytotoxicité sur neuroblastomes (Neuro 2A). Les bio-essais souris ont été réalisés par HydrôRéunion (CBEM) et les tests cellulaires par l'IRTA en Espagne.

Le présent rapport expose les résultats obtenus par ces deux techniques.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Les échantillons

Deux espèces de requin ont été reçues :

- Le requin tigre (*Galeocerdo cuvier*), RT
- Le requin bouledogue (*Carcharhinus leucas*), RB

Les captures et autopsies ont été organisées par le CRPMEM dans le cadre des projets « Valorequin » et « CapRequin 2 ».

91 individus ont été livrés au laboratoire entre le 15 janvier 2015 et le 17 février 2016

- Pour les 45 RT, les captures ont été réalisées entre le 20 janvier 2014 et le 20 février 2015.
- Pour les 46 RB, les captures ont été réalisées entre le 14 février 2014 et le 11 février 2016.

Les échantillons de chair collectés par le vétérinaire en charge des autopsies ont été référencés puis stockés dans un congélateur mis à disposition au CRPMEM, avant transfert au laboratoire situé sur la plateforme CYROI, qui héberge le laboratoire d'HydrôRéunion.

Une fois au laboratoire, les échantillons sont décongelés et sont aliquotés pour les futures analyses : 200g pour les recherches par bioessais souris et 30g pour le test cellulaire réalisés par l'IRTA en Espagne. Les restes sont ensuite recongelés puis entreposés, dans un deuxième temps, dans un entrepôt dédié, à -20°C mis à disposition par la CCI sur le Port Ouest.

Le transfert des échantillons sur l'IRTA s'est fait en trois fois :

- Le 30/03/15 avec 2 échantillons de RB (premiers échantillons pour tests méthodologiques)
- le 08/06/2015 qui a concerné tous les échantillons de RT,
- le 29 février 2016 pour tous les échantillons de RB.

Le transport a été assuré sous carboglace, par une société spécialisée (CryoExpress, groupe Air Liquide), qui a réalisé une recharge en Carboglace sur Paris avant le transfert en Espagne.

Les deux envois ont permis la livraison des échantillons dans les conditions requises.

Synthétiquement les échantillons reçus au laboratoire proviennent de requins ayant les caractéristiques suivantes :

- Pour les 45 RT, 22 mâles et 23 femelles avec une taille variant de 196 cm (32,8 kg) à 402 cm (423 kg).
- Pour les 46 RB, 22 mâles et 24 femelles avec une taille variant de 137 cm (20,3 kg) à 322 cm (293,8 kg)

Un échantillon de RB (ref : 001-10022014) a été rejeté de l'analyse suite au premier bio-essais souris, des réponses anormales sur les souris ont été notées. Lors de l'extraction initiée au laboratoire des signes de dégradation importante avaient été notés (couleur verte, dégagement d'une odeur d'ammoniacale pugnace, qui a nécessité une protection renforcée du technicien en charge de l'opération. Le CRPMEM a confirmé dans un deuxième temps que ce spécimen avait séjourné plusieurs jours dans l'eau avant l'autopsie). Les analyses effectuées concernent donc 45 RB.

2.2. Le bioessais souris

Le bio-essais souris est un test largement utilisé à ce jour pour détecter les neurotoxines dans les poissons, en particulier celles du groupe des ciguatoxines. Bien décrit dans la littérature (EFSA, 2010 ; Hamilton *et al.*, 2002 ; Hoffman *et al.*, 1983 ; Lewis and Sellin, 1993 ; Vernoux, 1994), il a été normalisé au niveau Français depuis juin 2012 par la Méthode Anses Maisons-Alfort CAT-NAT 10.

Cette méthode a été évaluée par le comité d'éthique du CYROI et a reçu l'aval du Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche en 2015 (N° n° EU0450 - GIP CYROI - APAFIS - Autor. APAFIS #2641-2015110916009490).

Il permet de mettre en évidence la présence de ciguatoxines dans les tissus de poissons. Bien que trois familles de congénères aient été décrites dans l'Océan Pacifique, Indien et Atlantique, les structures des ciguatoxines restent suffisamment apparentées pour conserver le même mode d'action.

Ce bioessai sur souris est adapté au contrôle de la chair de requin.

Cette adaptation au traitement des échantillons de requin (matrice plus grasse) a été réalisé lors de la première phase. Les points suivants ont été modifiés : (i) des volumes de solvants augmentés, en particulier sur la partition Méthanol aqueux / Hexane qui permet de purifier la phase lipophile, et (ii) une analyse augmentée par injection (i.p.) de chaque échantillon sur des lots de 3 souris au minimum. Cependant, l'absence de standard ne permet pas la réalisation de contrôle interne pour tester la qualité de l'extraction. Le contrôle interne a été réalisé sur la base d'un échantillon de poisson (*Lutjanus bohar*) positif (ciguatoxique) du laboratoire.

Ce protocole a été utilisé pour l'analyse de l'échantillon de requin responsable de l'intoxication de Fenerive-Est, une toxicité a été détectée par ce bioessais, confirmée par le test sur Neuro2A (cf. avis de l'Anses, saisine 2013-SA-0198).

Le principe général consiste à extraire des échantillons de chair de poisson avec de l'acétone puis de purifier par deux séparations liquide/liquide à l'hexane et au diéthyl ether. Cette extraction fait appel au caractère lipophile des toxines. L'extrait contenant les toxines est ensuite solubilisé dans du tween 60 1-5% salin puis injecté par voie intrapéritonéale (i.p.) à des souris (20 ± 2 g). Trois souris sont observées continuellement pendant les deux premières heures, puis contrôlées régulièrement jusqu'à 24h après injection. L'interprétation des résultats repose sur les symptômes observés et le délai de survie des souris.

2.3. Le test cellulaire Neuro2A

La majeure partie des phycotoxines est détectable via les tests de cytotoxicité cellulaire (Cembella *et al.*, 1995). Ces méthodes sont intéressantes en ce qu'elles présentent une très forte sensibilité aux ciguatoxines et sa détection à de faibles concentrations dans les échantillons (Caillaud *et al.* 2010). Également les tests cellulaires permettent la gestion d'un grand nombre d'échantillons (i.e. automatisation possible) et pour les CTXs la méthode apparaît comme une bonne alternative aux tests sur animaux vivants.

Le test de cytotoxicité, lorsqu'il est pratiqué sur neuroblastomes (Neuro-2A), utilise l'action combinée de la vétratridine et de l'ouabaïne qui agissent comme des potentialisateurs des effets des toxines activatrices du canal sodique telles que les ciguatoxines (CTX) (Manger *et al.*, 1993 ; Dechraoui *et al.*, 2005, Caillaud *et al.* 2012). La limite de quantification du test a été estimée à 0,039 µg eq. P-CTX-1 kg⁻¹ par Déchraoui *et al.* (2005) et à 0,001 µg eq. P-CTX-1 kg⁻¹ par Caillaud *et al.* (2012).

Des cellules Neuro-2a sont cultivées en plaques de 96 puits. Elles sont exposées pendant 24h à un étalon de ciguatoxines (P-CTX-1, obtenue du Pr. Richard Lewis d'Australie) et à des extraits de poisson. En disposant de la courbe dose-réponse pour l'étalon de CTX, la mesure de la mortalité cellulaire permet d'établir les quantités d'équivalents CTXs présentes dans le poisson.

Préalablement à la réalisation du test, des pré-tests sont réalisés pour vérifier la non-toxicité des extraits de poissons (effet de la matrice) aux concentrations étudiées en absence d'ouabaïne et de vétratridine. Cette vérification préliminaire vise essentiellement à caractériser la concentration maximale d'extrait qu'il est possible de tester et pour laquelle la mort des cellules de Neuro-2a n'est pas imputable à un effet matrice. Cette concentration maximale d'extrait est variable en fonction des matrices biologiques testées.

Les tests sur les échantillons reçus ont été réalisés à une concentration maximale de 200 mg d'équivalents poids frais /mL, ou à des concentrations plus basses à cause de l'effet matrice de l'échantillon.

Ce test cellulaire n'est pas encore maîtrisé par le laboratoire d'HydrôRéunion (mise au point en cours sur 2016-2017), il a donc été réalisé par l'IRTA dans le cadre du projet. C'est ce laboratoire qui avait réalisé les tests sur les premiers échantillons du projet en phase 1.

Extractions

Les extractions pour le test cellulaire ont été réalisées à l'IRTA.

Les analyses ont été effectuées sur un minimum de 10 g de chair de chaque poisson.

La préparation des extraits se fait suite à une extraction acétonique des échantillons, suivie de purifications complémentaires selon le protocole de Hydro Réunion employé pour le test souris.

Abréviations :

CTX : ciguatoxine

CTX (ppb) : pg eq P-CTX-1/mg tissu frais.

Effet Matrice : la viabilité cellulaire augmente ou diminue en conditions "O/V - ", variation > 20%.

ND : Non détectable à cause de l'effet matrice.

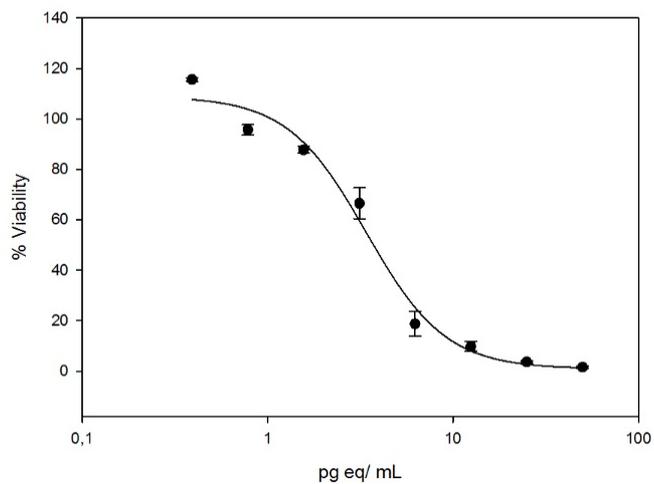


Figure 1 : Exemple d'une courbe dose réponse obtenue lors du projet avec du standard P-CTX-1.

3. Résultats

3.1. *Carcharhinus leucas*

3.1.1. Le bioessai souris

| Référence CRPMEM | Espèce | Date de pêche | Sexe | Longueur Totale (LT, (cm) | Masse calculée (kg) | Référence HR | Date de réception | Résultat |
|------------------|----------------------------|---------------|------|---------------------------|---------------------|--------------|-------------------|----------|
| 001-14022014 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 14/02/2014 | M | 300,0 | 218,7 | 15/013 | 15/01/2015 | Négatif |
| 001-20032014 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 20/03/2014 | F | 205,0 | 73,3 | 15/014 | 15/01/2015 | Négatif |
| 001-15042014 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 14/04/2014 | F | 310,0 | 250,6 | 15/015 | 15/01/2015 | Négatif |
| 001-28042014 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 27/04/2014 | F | 301,0 | 232,2 | 15/016 | 15/01/2015 | Négatif |
| 001-16062014 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 16/06/2014 | F | 313,0 | 290,3 | 15/017 | 15/01/2015 | Négatif |
| 001-26062014 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 25/06/2014 | F | 241,0 | 127,7 | 15/018 | 15/01/2015 | Négatif |
| 001-06082014 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 06/08/2014 | M | 310,0 | 241,7 | 15/028 | 15/01/2015 | Négatif |
| 001-26082014 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 26/08/2014 | F | 295,0 | 229,2 | 15/034 | 15/01/2015 | Négatif |
| 002-04122014 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 03/12/2014 | F | 290,0 | 206,2 | 15/072 | 20/01/2015 | Négatif |
| 001-11092014 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 11/09/2014 | M | 290,0 | 186,9 | 15/079 | 17/03/2015 | Négatif |
| 002-11092014 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 11/09/2014 | M | 258,0 | 124,9 | 15/080 | 17/03/2015 | Négatif |
| 003-11092014 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 11/09/2014 | M | 208,0 | 71,4 | 15/082 | 15/01/2015 | Négatif |
| 001-15102014 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 14/10/2014 | F | 226,0 | 101,5 | 15/083 | 20/01/2015 | Négatif |
| 001-16022015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 16/02/2015 | F | 221,0 | 86,7 | 15/084 | 17/03/2015 | Négatif |
| 001-17022015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 17/02/2015 | M | 208,0 | 68,8 | 15/085 | 17/03/2015 | Négatif |
| 002-20022015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 20/02/2015 | F | 243,0 | 114,1 | 15/086 | 17/03/2015 | Négatif |
| 001-02042015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 01/04/2015 | F | 235,0 | 110,4 | 15/090 | 02/09/2015 | Négatif |
| 001-04062015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 02/06/2015 | F | 272,0 | 169,8 | 15/091 | 02/09/2015 | Négatif |
| 001-23072015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 23/07/2015 | M | 210,0 | 75,5 | 15/092 | 02/09/2015 | Négatif |
| 001-30072015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 30/07/2015 | M | 250,0 | 134,8 | 15/093 | 02/09/2015 | Négatif |
| 002-30072015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 30/07/2015 | M | 273,0 | 151,7 | 15/094 | 02/09/2015 | Négatif |
| 001-31082015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 30/08/2015 | M | 264,0 | 136,9 | 15/095 | 02/09/2015 | Négatif |
| 001-08092015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 08/09/2015 | F | 270,0 | 162,7 | 15/106 | 19/10/2015 | Négatif |
| 001-25092015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 24/09/2015 | F | 307,0 | 244,3 | 15/107 | 19/10/2015 | Négatif |
| 001-08102015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 07/10/2015 | M | 154,0 | 31,7 | 15/108 | 19/10/2015 | Négatif |
| 002-08102015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 07/10/2015 | F | 137,0 | 20,3 | 15/109 | 19/10/2015 | Négatif |
| 001-16102015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 15/10/2015 | M | 248,0 | 128,8 | 15/110 | 19/10/2015 | Négatif |
| 002-25092015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 24/09/2015 | F | 285,0 | 179,8 | 15/114 | 09/11/2015 | Négatif |
| 002-21102015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 20/10/2015 | F | 309,0 | 257,0 | 15/115 | 09/11/2015 | Négatif |
| 001-22102015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 22/10/2015 | F | 322,0 | 293,8 | 15/116 | 09/11/2015 | Négatif |
| 001-04112015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 03/11/2015 | M | 225,0 | 90,2 | 15/117 | 09/11/2015 | Négatif |
| 001-07122015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 07/12/2015 | F | 283,0 | 187,5 | 16/001 | 19/01/2016 | Négatif |
| 002-07122015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 07/12/2015 | M | 270,0 | 156,1 | 16/002 | 19/01/2016 | Négatif |
| 002-17122015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 16/12/2015 | F | 291,0 | 200,7 | 16/003 | 19/01/2016 | Négatif |
| 003-17122015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 17/12/2015 | M | 270,0 | 156,1 | 16/004 | 19/01/2016 | Négatif |
| 001-18122015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 18/12/2015 | F | 270,0 | 162,7 | 16/005 | 19/01/2016 | Négatif |
| 001-28122015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 27/12/2015 | F | 291,0 | 214,7 | 16/006 | 19/01/2016 | Négatif |
| 001-13012016 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 12/01/2016 | M | 197,0 | 62,5 | 16/007 | 17/02/2016 | Négatif |
| 002-13012016 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 12/01/2016 | M | 210,0 | 74,1 | 16/008 | 17/02/2016 | Négatif |
| 001-28012016 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 27/01/2016 | F | 305,0 | 229,2 | 16/009 | 17/02/2016 | Négatif |
| 002-28012016 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 27/01/2016 | M | 284,0 | 174,6 | 16/010 | 17/02/2016 | Négatif |
| 004-28012016 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 28/01/2016 | M | 208,0 | 67,5 | 16/011 | 17/02/2016 | Négatif |
| 001-29012016 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 29/01/2016 | M | 291,0 | 192,0 | 16/012 | 17/02/2016 | Négatif |
| 001-04022016 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 03/02/2016 | M | 279,0 | 167,5 | 16/013 | 17/02/2016 | Négatif |
| 001-11022016 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 11/02/2016 | F | 232,0 | 110,4 | 16/014 | 17/02/2016 | Négatif |

3.1.2. Le test cellulaire neuro2A

| Références CRPMEM | Espèce | LQ | CTX (ppb) | Observations |
|---------------------|-----------------------------------|--------------|----------------|---|
| 001-14022014 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,130 | < LQ | Effet Matrice |
| 001-20032014 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,041 | < LQ | Effet Matrice |
| 001-15042014 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,065 | < LQ | |
| 001-28042014 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,065 | < LQ | |
| 001-16062014 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,041 | < LQ | |
| 001-26062014 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,041 | < LQ | |
| 001-06082014 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,065 | < LQ | |
| 001-26082014 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,065 | < LQ | |
| 001-11092014 | <i>Carcharhinus leucas</i> | - | ND | Effet Matrice |
| 002-11092014 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,065 | < LQ | Effet Matrice |
| 003-11092014 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,065 | < LQ | Effet Matrice |
| 001-15102014 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,065 | < LQ | Effet Matrice |
| 002-04122014 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,041 | < LQ | Effet Matrice |
| 001-16022015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,065 | < LQ | Effet Matrice |
| 001-17022015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,065 | < LQ | Effet Matrice |
| 002-20022015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,065 | < LQ | Effet Matrice |
| 001-02042015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,010 | < LQ | Effet Matrice |
| 001-04062015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,065 | < LQ | Effet Matrice |
| 001-23072015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,065 | < LQ | Effet Matrice |
| 001-30072015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,065 | < LQ | |
| 002-30072015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,010 | < LQ | Effet Matrice, Possible présence de CTXs |
| 001-31082015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,065 | < LQ | |
| 001-08092015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,065 | < LQ | |
| 001-25092015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,065 | < LQ | |
| 002-25092015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,065 | < LQ | |
| 001-08102015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,065 | < LQ | |
| 002-08102015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,130 | < LQ | Effet Matrice |
| 001-16102015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,130 | < LQ | Effet Matrice |
| 002-21102015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | - | ND | Effet Matrice |
| 001-22102015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | - | ND | Effet Matrice |
| 001-04112015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | - | ND | Effet Matrice |
| 001-07122015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,065 | < LQ | Effet Matrice |
| 002-07122015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,041 | < LQ | Effet Matrice |
| 002-17122015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,041 | < LQ | |
| 003-17122015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,041 | < LQ | |
| 001-18122015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,041 | < LQ | |
| 001-28122015 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,041 | < LQ | |
| 001-13012016 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,041 | < LQ | Effet Matrice |
| 002-13012016 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,041 | < LQ | |
| 001-28012016 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,041 | < LQ | |
| 002-28012016 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,041 | < LQ | Effet Matrice |
| 004-28012016 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,041 | < LQ | |
| 001-29012016 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,041 | < LQ | Effet Matrice |
| 001-04022016 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,041 | < LQ | Effet Matrice |
| 001-11022016 | <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,020 | < LQ | Effet Matrice |

Les LQ obtenues pour ces échantillons varient de 0,020 à 0,130 µg eq P-CTX1. Kg⁻¹

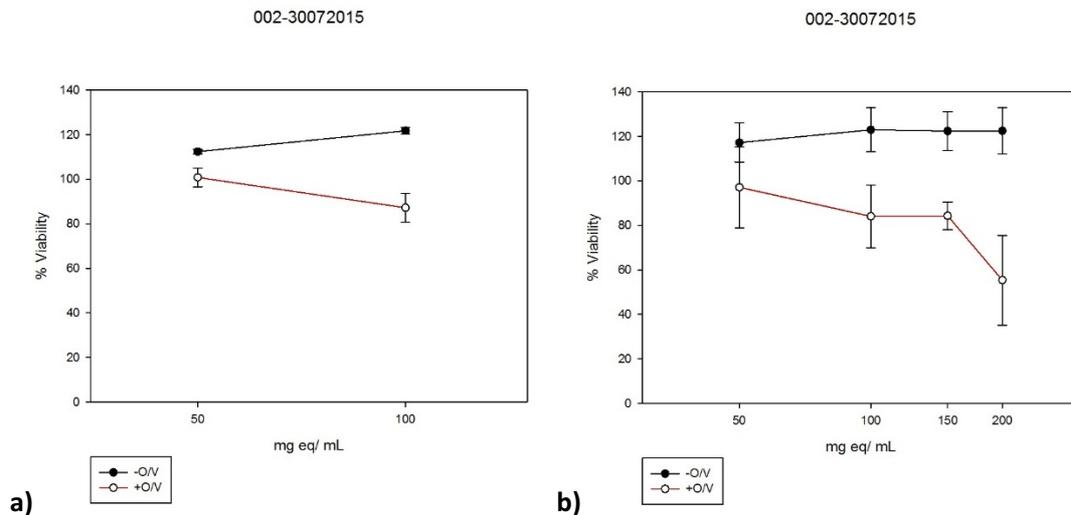


Figure 2 : Courbe dose-réponse du poisson douteux : requin bouledogue 002-30072015.

a) Test en conditions normales.

b) Test en conditions forcées avec concentrations en Ouabaine / Vératridine fortes.

Un effet matrice avec augmentation de la viabilité est observé dans les conditions sans Ouabaine/Veratridine (courbe en noir). Dans la condition a) une diminution de la viabilité, < 20 %, est observée en présence d'Ouabaine/Vératridine (Courbe rouge). Dans la condition b) cette diminution de la viabilité est plus forte.

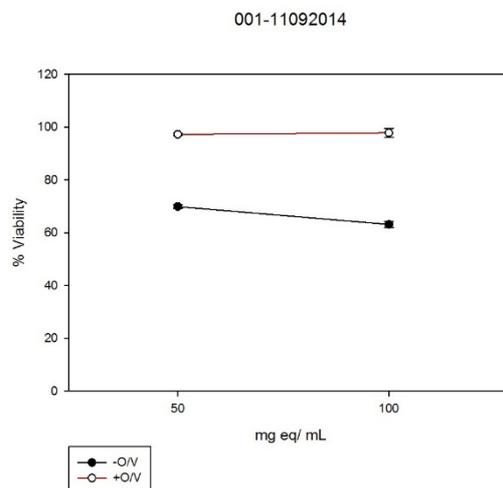


Figure 3 : Courbe dose -réponse d'un poisson qui n'a pas pu être évalué (ND) : requin bouledogue 001-11092014. Un fort effet matrice est obtenu en conditions sans Ouabaine/Vératridine (courbe en noir)

3.2. Galeocerdo cuvier

3.2.1. Le bioessais souris

| Référence CRPMEM | Espèce | Date de pêche | Sexe | Longueur Totale (LT, (cm) | Masse calculée (kg) | Référence HR | Date de réception | Résultat |
|------------------|--------------------------|---------------|------|---------------------------|---------------------|--------------|-------------------|----------|
| 001-22012014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 21/01/2014 | M | 353,0 | 360,6 | 15/010 | 15/01/2015 | Négatif |
| 002-22012014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 20/01/2014 | M | 319,0 | 191,3 | 15/011 | 15/01/2015 | Négatif |
| 001-04022014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 04/02/2014 | M | 385,0 | 379,5 | 15/012 | 15/01/2015 | Négatif |
| 001-27062014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 26/06/2014 | M | 310,0 | 201,1 | 15/019 | 15/01/2015 | Négatif |
| 001-01072014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 01/07/2014 | F | 387,0 | 435,9 | 15/020 | 15/01/2015 | Négatif |
| 001-02072014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 02/07/2014 | F | 246,0 | 89,9 | 15/021 | 15/01/2015 | Négatif |
| 002-02072014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 02/07/2014 | F | 340,0 | 243,4 | 15/022 | 15/01/2015 | Négatif |
| 003-02072014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 02/07/2014 | F | 259,0 | 88,5 | 15/023 | 15/01/2015 | Négatif |
| 001-03072014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 03/07/2014 | F | 288,0 | 134,0 | 15/024 | 15/01/2015 | Négatif |
| 001-17072014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 17/07/2014 | F | 367,0 | 338,8 | 15/025 | 15/01/2015 | Négatif |
| 001-22072014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 22/07/2014 | F | 312,0 | 179,6 | 15/026 | 15/01/2015 | Négatif |
| 001-23072014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 23/07/2014 | F | 355,0 | 260,8 | 15/027 | 15/01/2015 | Négatif |
| 001-07082014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 06/08/2014 | M | 369,0 | 335,3 | 15/029 | 15/01/2015 | Négatif |
| 001-12082014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 12/08/2014 | F | 383,0 | 375,6 | 15/032 | 15/01/2015 | Négatif |
| 001-25082014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 25/08/2014 | F | 348,0 | 269,7 | 15/033 | 15/01/2015 | Négatif |
| 001-09092014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 09/09/2014 | M | 286,0 | 141,6 | 15/035 | 15/01/2015 | Négatif |
| 002-09092014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 09/09/2014 | M | 360,0 | 282,1 | 15/036 | 15/01/2015 | Négatif |
| 003-09092014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 09/09/2014 | F | 324,0 | 211,1 | 15/037 | 15/01/2015 | Négatif |
| 001-10092014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 10/09/2014 | F | ND | 411,0 | 15/038 | 20/01/2015 | Négatif |
| 002-10092014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 10/09/2014 | F | 300,0 | 166,3 | 15/052 | 20/01/2015 | Négatif |
| 003-10092014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 10/09/2014 | F | 336,0 | 226,9 | 15/053 | 17/03/2015 | Négatif |
| 004-10092014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 10/09/2014 | M | 325,0 | 208,6 | 15/054 | 17/03/2015 | Négatif |
| 005-10092014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 10/09/2014 | M | 320,0 | 188,9 | 15/055 | 17/03/2015 | Négatif |
| 006-10092014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 10/09/2014 | F | 315,0 | 132,2 | 15/056 | 17/03/2015 | Négatif |
| 001-16092014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 16/09/2014 | F | 372,0 | 335,3 | 15/057 | 17/03/2015 | Négatif |
| 001-01102014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 01/10/2014 | M | 336,0 | 260,8 | 15/058 | 20/01/2015 | Négatif |
| 001-02102014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 02/10/2014 | M | 304,0 | 143,6 | 15/059 | 20/01/2015 | Négatif |
| 001-07102014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 07/10/2014 | F | 333,0 | 252,0 | 15/060 | 20/01/2015 | Négatif |
| 001-14102014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 13/10/2014 | F | 301,0 | 143,6 | 15/061 | 17/03/2015 | Négatif |
| 001-03112014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 03/11/2014 | F | 402,0 | 423,4 | 15/062 | 20/01/2015 | Négatif |
| 002-03112014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 03/11/2014 | M | 347,0 | 254,9 | 15/063 | 20/01/2015 | Négatif |
| 001-07112014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 06/11/2014 | M | 351,0 | 321,4 | 15/064 | 20/01/2015 | Négatif |
| 001-10112014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 10/11/2014 | F | 362,0 | 311,2 | 15/065 | 20/01/2015 | Négatif |
| 001-13112014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 13/11/2014 | M | 352,0 | 272,8 | 15/066 | 20/01/2015 | Négatif |
| 001-24112014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 24/11/2014 | M | 356,0 | 275,9 | 15/067 | 20/01/2015 | Négatif |
| 001-27112014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 27/11/2014 | M | 343,0 | 237,8 | 15/068 | 20/01/2015 | Négatif |
| 002-27112014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 27/11/2014 | F | 292,0 | 132,2 | 15/069 | 20/01/2015 | Négatif |
| 001-02122014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 02/12/2014 | M | 367,0 | 301,3 | 15/070 | 20/01/2015 | Négatif |
| 001-04122014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 04/12/2014 | M | 375,0 | 349,6 | 15/071 | 20/01/2015 | Négatif |
| 003-04122014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 03/12/2014 | F | 319,0 | 206,0 | 15/073 | 20/01/2015 | Négatif |
| 001-12122014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 11/12/2014 | M | 350,0 | 279,0 | 15/074 | 20/01/2015 | Négatif |
| 002-12122014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 11/12/2014 | M | 334,0 | 206,0 | 15/075 | 20/01/2015 | Négatif |
| 001-13122014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 12/12/2014 | M | 300,0 | 155,7 | 15/076 | 20/01/2015 | Négatif |
| 001-18022015 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 18/02/2015 | F | 196,0 | 32,8 | 15/077 | 17/03/2015 | Négatif |
| 001-20022015 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 20/02/2015 | M | 297,0 | 132,2 | 15/078 | 17/03/2015 | Négatif |

3.2.2. Le test cellulaire neuro2A

| Références CRPMEM | Espèce | LQ | CTX (ppb) | Observations |
|---------------------|---------------------------------|--------------------|-------------------|----------------|
| 001-24112014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,008 | < LQ | Effet Matrice |
| 001-04122014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,041 | < LQ | |
| 001-22012014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,041 | < LQ | |
| 002-22012014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,041 | < LQ | |
| 001-04022014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,041 | < LQ | Effet Matrice |
| 001-27062014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,041 | < LQ | Effet Matrice |
| 001-01072014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,020 | < LQ | |
| 001-02072014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,002-0,041 | 0,02- 0,10 | POSITIF |
| 002-02072014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,041 | < LQ | Effet Matrice |
| 003-02072014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,041 | < LQ | Effet Matrice |
| 001-03072014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,041 | < LQ | Effet Matrice |
| 001-17072014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,041 | < LQ | |
| 001-22072014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,041 | < LQ | |
| 001-23072014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,020 | < LQ | |
| 001-07082014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,041 | < LQ | Effet Matrice |
| 001-12082014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,041 | < LQ | |
| 001-25082014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,041 | < LQ | |
| 001-09092014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,020 | < LQ | |
| 002-09092014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,041 | < LQ | |
| 003-09092014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,041 | < LQ | Effet Matrice |
| 001-10092014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,041 | < LQ | Effet Matrice |
| 002-10092014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,041 | < LQ | Effet Matrice |
| 003-10092014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,041 | < LQ | |
| 004-10092014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,041 | < LQ | Effet Matrice |
| 005-10092014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,041 | < LQ | |
| 006-10092014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,020 | < LQ | Effet Matrice |
| 001-16092014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,020 | < LQ | Effet Matrice |
| 001-01102014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,041 | < LQ | |
| 001-02102014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,020 | < LQ | |
| 001-07102014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,041 | < LQ | |
| 001-14102014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,041 | < LQ | Effet Matrice |
| 001-03112014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,041 | < LQ | |
| 002-03112014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,041 | < LQ | |
| 001-07112014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,041 | < LQ | |
| 001-10112014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,041 | < LQ | |
| 001-13112014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,041 | < LQ | |
| 001-27112014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,041 | < LQ | |
| 002-27112014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,041 | < LQ | |
| 001-02122014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,041 | < LQ | |
| 003-04122014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,041 | < LQ | |
| 001-12122014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,041 | < LQ | |
| 002-12122014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,041 | < LQ | |
| 001-13122014 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,041 | < LQ | Effet Matrice |
| 001-18022015 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,041 | < LQ | |
| 001-20022015 | <i>Galeocerdo cuvier</i> | 0,041 | < LQ | |

Les LQ obtenues pour ces échantillons varient de 0,002 à 0,041 µg eq P-CTX1. Kg⁻¹

003-10092014

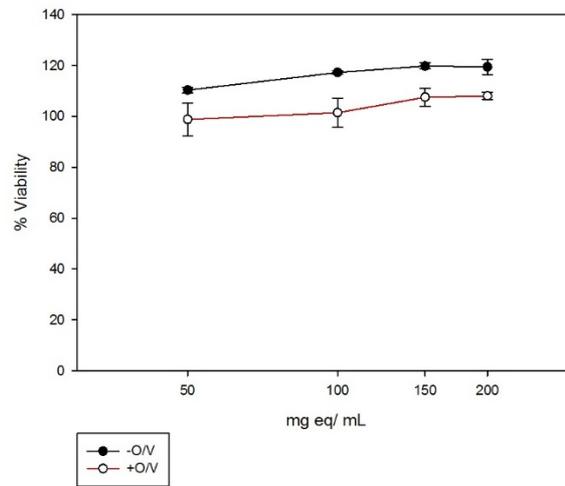


Figure 4 : Courbe dose-réponse d'un poisson négatif : requin tigre 003-10092014.

001-02072014

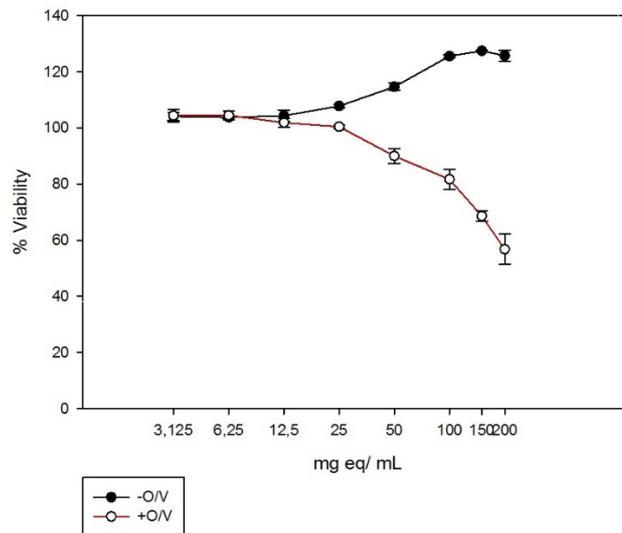


Figure 5 : Courbe dose-réponse du poisson positif : requin tigre 001-02072014.

Un effet matrice avec une augmentation de la viabilité est observé dans les conditions sans Ouabaïne/Veratridine (courbe en noir), mais un effet clair, dépendant de la dose, de mortalité cellulaire de type CTX est observé en présence d'Ouabaïne/Vératridine (Courbe rouge).

4. Conclusions

Les 90 échantillons testés par bioessais souris sont négatifs. Les symptômes connus des toxines de requin injectées à des souris sont : paralysies des membres, dyspnée, convulsions, diarrhées, et mortalité par arrêt respiratoire en quatre heures, au-delà, les animaux récupèrent (Boisier *et al.*, 1995 ; rapport d'expertise Anses 2014). Ces symptômes n'ont pas été observés pour ces échantillons testés. Comme pour le projet en phase 1 (analyses de 24 échantillons) certains signes atypiques (diarrhées brèves) ont été observés pour près de 85% des échantillons analysés de *Carcharhinus leucas* et de *Galeocerdo cuvier* testés. Cet effet pourrait être dû à la matrice.

Des 90 échantillons testés par test cellulaire neuro 2A, l'échantillon 001-02072014 de requin tigre (*Galeocerdo cuvier*) est positif pour CTXs avec une quantification de l'ordre de 0,02 - 0,10 µg eq P-CTX-1. Kg⁻¹ tissu frais. Cette concentration est supérieure à la limite considérée sans risque pour l'homme (0,01 µg eq P-CTX-1. Kg⁻¹), EFSA (2010).

Un deuxième échantillon, 002-30072015 de requin bouledogue (*Carcharhinus leucas*) a montré un effet de type CTX mais avec un effet matrice important. Cet effet matrice ne permet pas de confirmer et de quantifier la possible présence de toxines de type « ciguatoxines ».

Le reste des échantillons testés sur le modèle cellulaire ne montrent pas de toxicité de type ciguatoxines.

Quatre échantillons de *Carcharhinus leucas* (001-11092014 / 002-21102015 / 001-22102015 / 001-04112015) ont un effet matrice très fort et ceci a empêché la détection des CTXs. Une révision des protocoles d'extraction serait nécessaire, ou des expositions à des plus faibles doses, ce qui augmenterait considérablement la limite de quantification (LQ).

Les LQ obtenues pour ces échantillons sont variables varient de 0,002 à 0,130 µg eq P-CTX-1. Kg⁻¹. Elles ont été plus homogènes pour les échantillons de requin tigrés (*Galeocerdo cuvier*, 0,002 à 0,041 µg eq P-CTX-1. Kg⁻¹) et plus hétérogènes pour les requins bouledogues.

Ces LQ restent élevées, et comparables à celles obtenues des échantillons de la phase 1 du projet. Cela est due à la matrice, ce type d'échantillon étant particulièrement gras. Les matrices de requins ont donc un impact sur la viabilité cellulaire, qui ne permet pas d'avoir des LQ faibles pour certains échantillons ne permet pas la détection des CTXs pour d'autre avec les méthodes d'extractions utilisées.

En l'absence d'échantillon naturellement contaminé, il n'a pas été permis d'améliorer ces méthodes d'extraction afin de limiter l'effet matrice. Les quantités restantes de chair et de foie des deux échantillons, qui ont montré une réponse positive de type CTX, peuvent permettre d'améliorer les techniques d'extractions et ainsi d'envisager dans le futur d'abaisser les LQ du test cellulaire.

L'identification des toxines des deux échantillons pourraient être envisagée par des méthodes physico-chimiques (spectrométrie de masse LC/MSMS), cela conformément aux recommandations de l'expertise Anses (2014).

5. Références :

Anses, (2014). État des connaissances relatives à la contamination des requins, notamment tigre et bouledogue, par des ciguatoxines : occurrence, méthodes analytiques, cas humains rapportés et éléments d'éthologie pour ces deux espèces de requins. *Avis de l'ANSES, saisine n°2013-SA-0198*. 84pp.

Boisier P., Ranaivoson G., Rasolofonirina N., Andriamahefazafy B., Roux J., Chanteau S., Satake M., Yasumoto T., 1995. Fatal mass poisoning in Madagascar following ingestion of a shark (*Carcharhinus leucas*): clinical and epidemiological aspects and isolation of toxins. *Toxicon* 33(10), 1359-1364.

Caillaud A., H. Eixarch, P. de la Iglesia, M. Rodriguez, L. Dominguez, K.B. Andree & J. Diogène (2012): Towards the standardisation of the neuroblastoma (neuro-2a) cell-based assay for ciguatoxin-like toxicity detection in fish: application to fish caught in the Canary Islands, Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, DOI:10.1080/19440049.2012.660707

Dechraoui, MYB, Tiedeken JA, Persad R, Wang Z, Granade HR, Dickey RW, Ramsdell JS (2005). Use of two detection methods to discriminate ciguatoxins from brevetoxins: Application to great barracuda from Florida Keys. *Toxicon*, 46, 261–270.

EFSA (2010). Panel on Contaminants in the Food Chain; Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Emerging toxins: Ciguatoxin group. *EFSA Journal* 2010; 8(6): 1627.

Hamilton B, Hurbungs M, Vernoux JP, Jones A, Lewis RJ (2002). Isolation and characterisation of Indian Ocean ciguatoxin. *Toxicon* 40, 685-693.

Hoffman PA, Granade HR, McMillan JP (1983). The mouse ciguatoxin bioassay: a dose-response curve and symptomatology analysis. *Toxicon* 21, 363-369.

Lewis RJ and Sellin M (1993). Recovery of ciguatoxin from fish flesh. *Toxicon* 31, 1333-1336.

Manger R, Leja L, Lee S, Hungerford J, Hokama Y, Dickey R, Granade H, Lewis R, Yasumoto T, Wekell M. (1995). Detection of sodium channel toxins: directed cytotoxicity assays of purified ciguatoxins, brevetoxins, saxitoxins, and seafood extracts. *J AOAC Int.* 78,521-527.

Vernoux JP (1994). The mouse ciguatoxin bioassay: directions for use to control fish for consumption. *Memoirs of the Queensland Museum* 34, 625-629.